

CHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
VON POLYSACCHARIDEN AUS DER GEWEBEKULTUR
VON ECHINACEA PURPUREA (L.) MOENCH

HERMANN STUPPNER

*Dies
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0019

Chemische und immunologische Untersuchungen
von Polysacchariden aus der Gewebekultur von
Echinacea purpurea (L.) Moench

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Hermann Stuppner
aus
Bozen

Juni 1985

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
 2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Zenk
- Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
I. Echinacea purpurea-purpurfarbener Sonnenhut..	2
II. Problemstellung	4
III. Pflanzliche Zellkulturen zur Produktion von nieder- und höhermolekularen Verbindungen	5
IV. Zellkulturen zur Gewinnung von Polysacchari- den	6
V. Eigene Untersuchungen	6
V.1. Anlegen der Echinacea purpurea Zellkulturen .	6
V.1. Produktionsbedingungen	6
TEIL A POLYSACCHARIDE AUS DEM ZELL-SUSPENSIONS- KULTURMEDIUM	8
I. Isolierung und Fraktionierung von Polysaccha- rid-Rohfraktionen	8
I.1. Versuche zur Verkürzung des Extraktionsvor- ganges	12
II. Darstellung der Einzelkomponenten EN 1 und weiterer Polysaccharidfraktionen aus der 1:1 Fällung	14
II.1. Immunologisches Screening einzelner Poly- saccharidfraktionen	16
II.2. Weitere Reinigung der Neutralfraktion EN 1 über Ionenaustauschchromatographie und Gel= filtration	17
III. Darstellung von Einzelkomponenten (PS EN 1 und AG) aus der 1:4 Fällung	18
III.1. Anionenaustauschchromatographie	19
III.2. Weitere Reinigungsschritte der Polysaccharide EN 4 und AG	20
IV. Prüfung der Polysaccharide EN 1, EN 4 und AG auf Homogenität und Molekulargewichtsbestim- mung	21

	Seite
IV.1. HP-GPC-Methode	21
IV.2. Molekulargewichtsbestimmung	25
V. Strukturaufklärung des Polysaccharides AG	28
V.1. Zuckeranalyse	28
V.2. Methylierungsanalyse	30
V.3. ^{13}C -NMR-Spektroskopie	34
V.4. Partialhydrolyse	39
V.5. Methylierungsanalyse des partiellen Hydro=	
lyseproduktes AGP	41
V.6. ^{13}C -NMR-Spektroskopie des partiellen Hydro=	
lyseproduktes AGP	42
V.7. Identifizierung der Uronsäure aus dem	
partiellen Hydrolyseprodukt AGP	44
V.8. Bestimmung der Bindungsverhältnisse der	
Uronsäure	46
V.9. Reduktion des methylierten Hydrolysepro=	
duktes AGP mit LiAlD_4	47
V.10. Zusammenfassung der Ergebnisse	50
VI. Strukturaufklärung von Polysaccharid EN 1	
und EN 4	53
VI.1. Bestimmung der Zuckerkomponenten	53
VI.2. Elementaranalyse und Proteinbestimmung	54
VI.3. Methylierungsanalysen von PS EN 1 und EN 4	54
VI.4. Partialhydrolyse des Polysaccharides EN 4 .	60
VI.5. Enzymatischer Abbau des Polysaccharides EN 4	62
VI.6. Acetolyse des Polysaccharides EN 4	70
VI.7. Enzymatischer Abbau des Polysaccharides	
EN 4 mit partiell gereinigter Endo-(1 $\rightarrow$ 4)-	
β -glucanase	76
VI.7.1. Enzymreinigung	76
VI.7.2. Enzymatischer Abbau des Polysaccharides EN 4	79
VI.7.3. Zuckerzusammensetzung der Xyloglucan-Oligo=	
saccharide	84
VI.7.4. Methylierungsanalyse der Bio-Gel P-2 Oligo=	
saccharidfraktionen	84

	Seite
VI. 8. Kernresonanzspektroskopie	90
VI. 8.1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie	90
VI. 8.2. ^1H -NMR-Spektroskopie	94
VI. 9. Enzymatische Behandlung der Xyloglucan- Oligosaccharide mit α -L-Fucosidase	96
VI.10. Bestimmung des Acetylgehaltes von Poly= saccharid EN 4	96
VI.10.1. Gaschromatographische Bestimmung	96
VI.10.2. Gehaltsbestimmung über ^{13}C -NMR-Spektro= skopie	97
VI.10.3. Lokalisierung der Acetylgruppen	97
VI.11. Zusammenfassung der Ergebnisse	99
 TEIL B ISOLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG EINES XYLOGLUCANS AUS DEM ZELLMATERIAL DER ECHINACEA-GEWEBEKULTUR	101
I.1. Isolierung von Polysaccharidfraktionen aus dem Zellmaterial	101
I.2. Darstellung einer Xyloglucan-Einzelkompo= nente (EZ 1) aus der 1:1 Fällung	101
I.3. Darstellung einer Einzelkomponente aus der 1:4 Fällung	103
I.4. Methylierungsanalyse des gereinigten Xyloglucans EZ 1	104
 TEIL C ISOLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG EINES XYLOGLUCANS AUS DER DROGE ECHINACEA PURPUREA	106
I.1. Isolierung von Rohpolysaccharidfraktionen	106
I.2. Darstellung eines gereinigten Xyloglucans EH 1 aus der 1:0,5 Fällung	106
I.3. Methylierungsanalyse des Xyloglucans EH 1	108

	Seite
TEIL D VERGLEICH DER POLYSACCHARIDE AUS DER GE= WEBEKULTUR MIT DENEN, DIE AUS DER INTAK= TEN PFLANZE ISOLIERT WERDEN KONNTEN	110
TEIL E IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN POLY= SACCHARIDEN	115
I.1. Beschreibung der verwendeten Testsysteme ...	115
I.1.1. Granulozyten-Test nach Brandt	115
I.1.2. Carbon-Clearance-Test	115
I.2. Phagozytoseaktivität der Polysaccharide aus Echinacea purpurea-Gewebekulturen	118
I.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Polysaccha= riden	121
TEIL F ECHINACEA PURPUREA PRESS-SAFT	122
I.1. Hydrophiler Preßsaftanteil	122
I.1.1. Isolierung und Charakterisierung eines Poly= saccharides aus dem Echinacea Preßsaft	122
I.1.2. Bestimmung der Zuckerzusammensetzung der Polysaccharidfraktion EPS	124
I.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	125
I.2. Lipophiler Preßsaftanteil	125
I.2.1. Überprüfung des Preßsaftes auf lipophile Inhaltsstoffe	125
I.3. Immunologische Untersuchungen des Echinacea= Preßsaftes	127
TEIL G ZUSAMMENFASSUNG	130
EXPERIMENTELLER TEIL	133
I. Herkunft der Drogen	133
I.1. Echinacea purpurea-Droge	
I.2. Echinacea purpurea-Zellkulturen	133
I.3. Echinacea purpurea Preßsaft	133
II. Allgemeine Arbeitsmethoden	133

	Seite
II.1. Physikalisch-chemische Untersuchungen	133
II.2. Säulenchromatographie	135
II.3. (HP-GPC)-HPLC-Gelpermeationschromatographie	137
II.4. Zuckeranalysator	138
II.5. Kontinuierliche Membranfiltration	138
II.6. Dünnschichtchromatographie	138
II.7. Dialyse	139
II.8. Uronsäurebestimmung	139
II.9. Proteinbestimmung	139
III. Spezielle Arbeitsmethoden	140
III.1. Isolierung der Polysaccharide aus dem Zell= kulturmedium	140
III.1.1. Isolierung der Rohpolysaccharide	140
III.1.2. Verkürztes Verfahren zur Darstellung der Rohpolysaccharide	141
III.1.3. Konzentrierung des Nährmediums über kontin= uierliche Membranfiltration	142
III.1.4. Isolierung der Einzelkomponenten aus der 1:1 Fällung	142
III.1.5. Isolierung der Einzelkomponenten aus der 1:4 Fällung	144
III.2. Isolierung der Polysaccharide aus dem Zell= material der Gewebekultur	147
III.2.1. Isolierung der Rohpolysaccharide	147
III.2.2. Isolierung von Einzelkomponenten aus der 1:1 Fällung	148
III.3. Isolierung von Polysacchariden aus Echina= cea purpurea-Droge	150
III.3.1. Isolierung der Rohpolysaccharide	150
III.3.2. Isolierung von Einzelkomponenten aus der 1:0,5 Fällung	150
III.4. Isolierung hydrophiler und lipophiler Substanzen aus dem Echinacea Preßsaft	150

	Seite
III. 4.1. 1:4 Fällung	150
III. 4.2. Auftrennung der 1:4 Fällung in einen hoch= molekularen und einen niedermolekularen Anteil	151
III. 4.3. Isolierung eines Polysaccharides aus dem Retentat	151
III. 4.4 Isolierung lipophiler Inhaltsstoffe aus dem Echinacea-Preßsaft	151
III. 5. Auftrennung der Cellulase in einzelne Enzymfraktionen	152
III. 6. Molekulargewichtsbestimmung	153
III. 7. Hydrolysebedingungen	153
III. 8. Quantitative Zuckerbestimmung	154
III. 8.1. Darstellung der Alditolacetate	154
III. 9. Darstellung der methylierten Alditolaceta= te	155
III.10. Darstellung der carboxyl-reduzierten methylierten Alditolacetate	156
III.11. Acetylierung von Polysacchariden	156
III.12. Acetolyse	157
III.13. Partialhydrolysen	158
III.14. Enzymatische Hydrolysen	158
III.14.1. Enzymatische Hydrolyse mit Cellulase	158
III.14.2. Enzymatische Hydrolyse mit Endo-(1→4)-β- D-glucanase	159
III.14.3. Prüfung auf α-(1→4)-verknüpfte Galaktu= ronsäure	159
III.14.4. Prüfung auf α-L-Fucose	159
III.15. Meßdaten	160
IV. Spezielle pharmakologische Arbeitsmethoden	161
IV.1. Granulozytentest nach Brandt	161
IV.2. Carbon-Clearance-Test	161
LITERATURVERZEICHNIS	162

EINLEITUNG

Aus der Droge *Echinacea purpurea* sind kürzlich in unserem Arbeitskreis Polysaccharide isoliert worden, für die eine immunstimulierende Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Da in letzter Zeit die Gewebekultur als interessante Alternative zur Gewinnung von pharmakologisch aktiven Naturstoffen immer mehr Bedeutung gewinnt, sollte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Zenk versucht werden, *Echinacea*-Polysaccharide auf diesem Weg darzustellen. Die Zellkultur-Methode hat den Vorteil, daß Produkte mit konstanterer chemischer Zusammensetzung und Ausbeute zu erhalten sind.

Die Polysaccharide sollten auf ihre immunologische Aktivität geprüft, in ihrer chemischen Struktur aufgeklärt und mit den aus der Droge isolierten Polysacchariden verglichen werden.

Außerdem sollte geprüft werden, ob in *Echinacea*-Preßsäften, die sehr häufig zur Gewinnung von Arzneipräparaten verwendet werden, Polysaccharide vorliegen bzw. ob und in welchem Maße diese an der immunologischen Gesamtwirkung beteiligt sind.

ALLGEMEINER TEIL

I. Echinacea purpurea-purpurfarbener Sonnenhut

Echinacea purpurea, eine zur Kompositen-(Asteraceen-) Familie gehörige Pflanze, die im östlichen Nordamerika beheimatet ist, wurde von der indianischen Urbevölkerung hauptsächlich zur Wundheilung verwendet. Die wissenschaftliche Untersuchung dieser Pflanze hat erst vor etwa 25 Jahren begonnen.

BÜSING (1) berichtete 1958 von einem positiven Einfluß von Echinacea-Präparaten auf den Properdinspiegel. CHONÈ (2) zeigte, daß Echinacin^R-Injektionen bei Kamen zu einer deutlichen Erhöhung der im Blut zirkulierenden Granulozyten führten. Bei " Strahlenpatienten " beobachtete POHL (3) einen signifikanten Anstieg der Leukozytenproduktion des Knochenmarkes, wenn diese vorher mit Echinacea-Präparaten behandelt worden waren. Aus neuerer Zeit liegen Untersuchungen über eine antivirale Wirksamkeit vor. WACKER und HILBIG (4) prüften Echinacea purpurea Preßsäfte auf ihre antivirale Aktivität. Eine positive Wirkung konnte nur dann erzielt werden, wenn die Zellkulturen vor der Viruseinwirkung mit dem Preßsaft behandelt worden waren. Die notwendige Vorinkubation läßt auf eine Interferon-ähnliche Wirkung schließen. EILMES (5) konnte diese Ergebnisse bestätigen. BÜSING und Mitarbeiter (6) berichten von einer Hyaluronidasehemmung durch Echinacea-Präparate. Dieses Enzym spielt eine wesentliche Rolle bei viralen und bakteriellen Infektionen. Durch Hyaluronidase-Hemmer bleibt die Infektion begrenzt, so daß sie durch körpereigene Abwehrmechanismen bekämpft werden kann. BONADEO und Mitarbeiter (7) isolierten aus Echinacea angustifolia ein Polysaccharid, das die Wundheilung fördert. Als Wirkungsmechanismus wurde die Ausbildung eines Komplexes zwischen Polysaccharid und

Hyaluronsäure diskutiert, was zu einer Hemmung der Hyaluronidase führen soll.

In jüngster Zeit haben WAGNER und PROKSCH (8) ebenfalls eine Polysaccharidfraktion aus *Echinacea purpurea* isoliert, die einen deutlichen Effekt auf das Immunsystem zeigte. Durch Ionenaustauschchromatographie gelang es, aus der Polysaccharidfraktion zwei Polysaccharide, ein Heteroxyylan mit einem Molekulargewicht von 35000 und ein Arabinorhamnogalaktan mit einem Molekulargewicht von 450000, darzustellen. Beide Verbindungen stimulierten im hohen Maße die Phagozytose, gemessen im Granulozyten- und Carbon-Clearance-Test (9). Im ^{14}C -Thymidin-Einbau-Test bei Lymphozyten zeigten die Polysaccharide die gleiche Wirkung, wie Concanavalin A. Außerdem konnte durch die beiden Polysaccharide im ^{51}Cr -Release-Test (10) eine Lymphozyten-unabhängige Stimulierung der Makrophagenaktivität festgestellt werden. Die so aktivierten Makrophagen erwiesen sich gegenüber Tumorzellen als cytotoxisch. Bezüglich der Inhaltsstoffe von *Echinacea purpurea* sei auf eine neuere Literaturübersicht (1980) von HARNISCHFEGGER und STOLZE (11) verwiesen.

II. Problemstellung

Nachdem die von PROKSCH (9) isolierten Polysaccharide zumindest als ein immunologisch wirksames Prinzip der Echinacea Droge erkannt worden waren, sollten Isolierungsverfahren gefunden werden, die schnell, einfach, reproduzierbar und in den industriellen Maßstab übertragbar waren. Voraussetzung war, daß die erhaltenen Produkte immer gleichbleibende Zusammensetzung und ein identisches Wirkprofil, d.h. eine gleich starke immunstimulierende Wirkung besaßen.

Erste Versuche in dieser Richtung zielten darauf hin, das von PROKSCH angewandte Extraktionsverfahren zu optimieren bzw. zu verkürzen. Da besonders die vielen Alkohol-fällungen äußerst kostenintensiv und zeitaufwendig sind, wurde versucht, die sauren, immunologisch aktiven Polysaccharidfraktionen direkt aus dem alkalischen Extrakt der Droge durch Ionenaustauschchromatographie zu isolieren. Dazu wurde der alkalische Extrakt neutralisiert, gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Dieses Produkt wurde in destilliertem Wasser gelöst, im Batch-Verfahren mit DEAE-Sephadex G-25 behandelt und anschließend die adsorbierten Polysaccharidfraktionen stufenweise mit 0,2 ,0,5 und 1 N NaCl-Lösung eluiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden einer erneuten Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex CL 6 B unterworfen und anschließend pharmakologisch untersucht. Die auf diese Weise dargestellten Polysaccharidfraktionen besaßen aber nicht mehr ausreichende immunologische Aktivität.

Den gleichen Wirkungsabfall beobachteten wir, wenn anstelle von Alkohol die Polysaccharide mit Cetyltrimethylammoniumbromid (12) ausgefällt wurden.

Nachdem alle diese Versuche wenig erfolgversprechend verlaufen waren, sollten Versuche unternommen werden,

das oben erwähnte Ziel über den Einsatz von Zellkulturen zu erreichen.

III. Pflanzliche Zellkulturen zur Produktion von nieder-und höhermolekularen Verbindungen

Entnimmt man einem intakten Pflanzenkörper einzelne Zellen, so lassen sich diese unabhängig von der Ausgangspflanze in speziellen Nährmedien kultivieren. Zwei grundlegende Eigenschaften besitzen solche Zellen: sie sind autonom und totipotent. Während normalerweise die Pflanze dem Alterungsprozeß unterworfen ist, der schließlich zu ihrem Tode führt, vermehren sich in Kulturen lebende Zellen durch Teilung, ohne daß eine Differenzierung eintritt. Trotzdem besitzt jede einzelne Zelle die gesamte genetische Information, um unter geeigneten Bedingungen einen intakten Organismus zu bilden (13). Aufgrund dieses Phänomens der Totipotenz lassen sich über Veränderungen der Umweltbedingungen oder Genmanipulationen gewünschte Eigenschaften der Zelle, wie die verbesserte Biosyntheseleistung hinsichtlich eines seltenen Naturstoffes, abrufen. So konnten bereits zahlreiche niedermolekulare Naturstoffe in teilweise sehr guter Ausbeute aus pflanzlichen Zellkulturen gewonnen werden, so z.B. Rosmarinsäure, Ubichinon-10, Ajmalin, Shikimisäure oder Shikonin. An höhermolekularen Verbindungen konnten in erster Linie pflanzliche Enzyme gewonnen werden. Der industrielle Einsatz der Gewebekulturen zur Gewinnung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe ist allerdings heute noch begrenzt. Über die bisherigen Ergebnisse siehe Übersichtsreferate von ZENK (13,14,15), MISAWA (16) und HALBROCK und GRISEBACH (17).

IV. Zellkulturen zur Gewinnung von Polysacchariden

Eine der ersten Veröffentlichungen über die Isolierung und Charakterisierung von Polysacchariden aus Zellkulturen stammt von ALBERSHEIM und Mitarbeitern (18, 19,20) aus dem Jahre 1973. Untersucht wurden die extrazellulär gebildeten Polysaccharide von Sycamor-(*Acer pseudo-platanus*)-Suspensionskulturen. Strukturell ähnliche Polysaccharide isolierte WILDER (21) aus *Phaseolus vulgaris*-Gewebekulturen. AKIYAMA und KATO (22,23) berichten ebenfalls von zwei extrazellulär gebildeten Polysacchariden, die aus Suspensionskulturen von Tabak isoliert werden konnten.

V. Eigene Untersuchungen

V.1. Anlegen der *Echinacea purpurea*-Zellkulturen

Die *Echinacea* Zellkulturen wurden im Laboratorium von Prof. ZENK (Universität München) angelegt. Sterile Blatt- und Stengelanteile (NaOCl 2%, 3'-60') aus selbstgezüchteten *Echinacea purpurea*-Beständen wurden auf festen Nährböden (LS, DAX, B5CM) zur Kallusbildung angelegt. Das LINSMAIER-SKOOG (LS)-Medium (24) erwies sich als am geeignetesten. Bereits nach 14 Tagen erfolgte die erste Kallusbildung. Nachdem sich der Kallus etabliert hatte, wurde er in ein flüssiges Nährmedium übertragen.

V.2. Produktionsbedingungen

Die Produktion der flüssigen Suspensionskulturen erfolgte in 1 bzw. 1,5 l Erlenmeyer-Kolben mit ca. 250 bzw. 1000 ml LS-Nährmedium. Nach etwa 14 Tagen wurden die Suspensionskulturen abfiltriert und der Zellrückstand gefriergetrocknet.

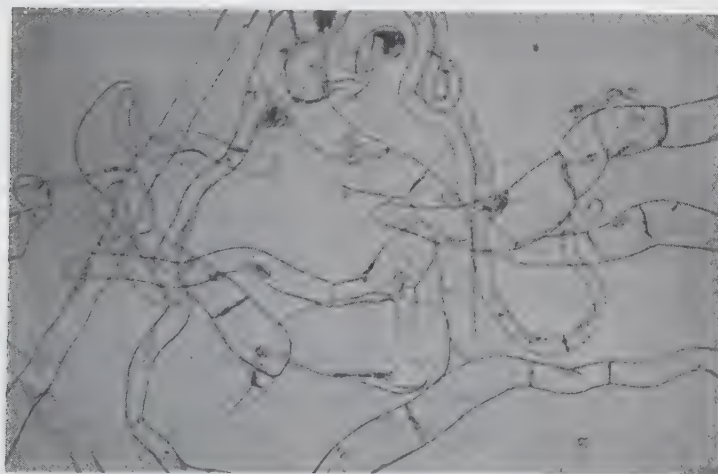
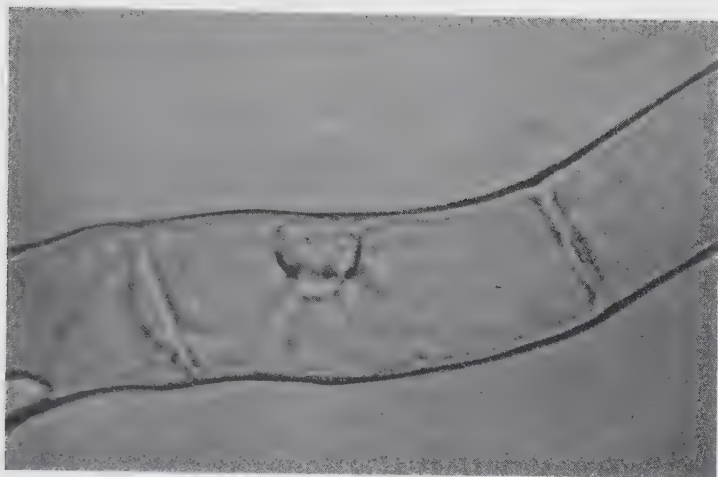


Abb.1

Zellen aus der *Echinacea purpurea* Gewebekultur

TEIL A POLYSACCHARIDE AUS DEM ZELL-SUSPENSIONS-KULTUR-MEDIUM

I. Isolierung und Fraktionierung von Polysaccharid-Rohfraktionen

In Anlehnung an das von CALDES und Mitarbeitern (25) (siehe Abb.2) verwendete Aufarbeitungsverfahren wurde das Filtrat der Suspensionskulturen mit dem dreifachen Volumen 95% Ethanol versetzt, über Nacht stehen gelassen, der gebildete Niederschlag am nächsten Tag abzentrifugiert und dieser in Wasser aufgenommen. Die trübe Lösung wurde unter Eiskühlung mit 15% Trichloressigsäure versetzt und damit Proteinanteile gefällt (26). Der Überstand wurde weiter mit dem vierfachen Volumen Ethanol behandelt, über Nacht stehen gelassen, anschließend abzentrifugiert und der Rückstand in 2% Natriumacetat-Lösung aufgenommen. Nach dem Abfiltrieren von unlöslichen Bestandteilen wurde die leicht trübe Lösung fraktioniert mit Ethanol gefällt (27). Die Ausfällungen wurden bei Ethanol-Konzentrationen von 50% und 80% erhalten. Die 1:1 und 1:4 Fällungsprodukte wurden abzentrifugiert, in Wasser gelöst und gegen demineralisiertes Wasser dialysiert. Die dialysierten Fraktionen wurden anschließend gefriergetrocknet. In folgender Tabelle wird die Polysaccharid-Ausbeute bei 1:1 und 1:4 Fällung angegeben.

Tabelle 1: Ausbeuten an Polysaccharid-Rohfraktionen

1:1 Fällungsprodukt	ca. 1%
1:4 Fällungsprodukt	ca. 0,5%

Die Prozentangaben beziehen sich auf den gefriergetrockneten Zellmaterialanteil (vgl. Exp. Teil)

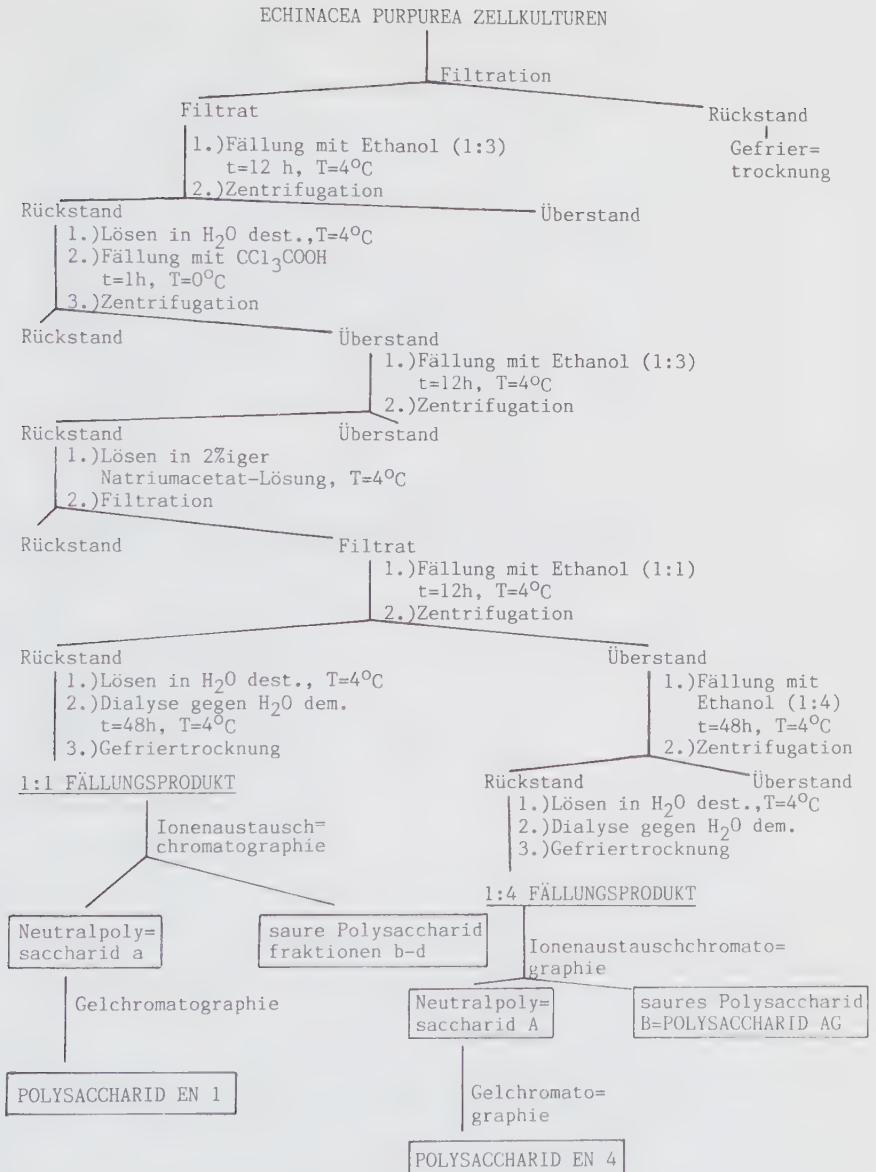


Abb.2 Schema zur Isolierung der Polysaccharide EN 1, EN 4 und AG aus dem Nährmedium der Echinacea-Gewebe-kultur

Aus der Zusammensetzung der 1:1 Fällung bzw. der 1:4 Fällung (Tabelle 2) konnte man noch keine Rückschlüsse auf speziell enthaltene Polysaccharide ziehen. Außer Mannose waren alle gängigen Neutralzucker vorhanden. Arabinose stellte dabei mengenmäßig den Hauptanteil dar. Abgesehen von der Rhamnose und der Glucose, die in der 1:4 Fällung überhaupt nicht bzw. in weit geringerem Maße vorhanden waren, konnten für die beiden Polysaccharidfraktionen nur geringfügige Unterschiede in der molaren Neutralzuckerzusammensetzung festgestellt werden. Anders verhielt es sich mit dem Uronsäuregehalt. In der 1:1 Fällung war der Uronsäuregehalt fast doppelt so hoch, wie in der 1:4 Fällung.

Tabelle 2: Molare Zuckerzusammensetzung der durch fraktionierte Fällungen erhaltenen Polysaccharidgemische

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: OV 225/T=210°C
Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/2h/100°C

Zucker	1:1 Fällung	1:4 Fällung
Rhamnose	0,15	—
Fucose	Spuren	Spuren
Arabinose	1,0	1,0
Xylose	0,7	0,6
Mannose	Spuren	Spuren
Galaktose	0,59	0,85
Glucose	0,43	0,1
Uronsäuren*	47,8%	23%

* Uronsäuregehalt in % bestimmt über den Carbazol-Test (28)

Nach Abb.3 und 4 erwiesen sich die 1:1 und die 1:4 Fällung in der HP-GPC-Analyse als heterogen. Beide Polysaccharidfraktionen wurden über den gesamten Fraktionierungsbereich der jeweiligen Säulensysteme eluiert. Da die abgebildeten

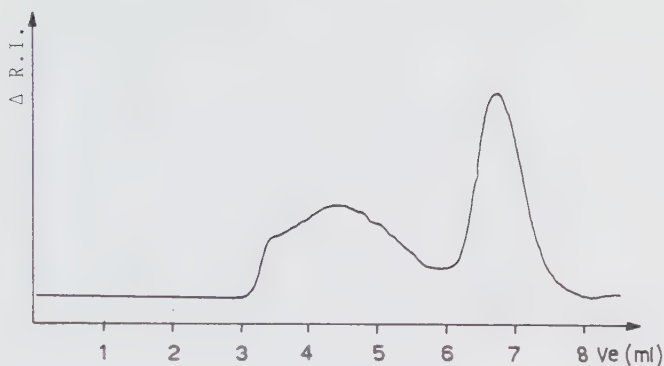


Abb. 3

HP-GPC-Chromatogramm des 1:1 Fällungsproduktes

Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500

Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH=6,0

Detektion: Refraktometer

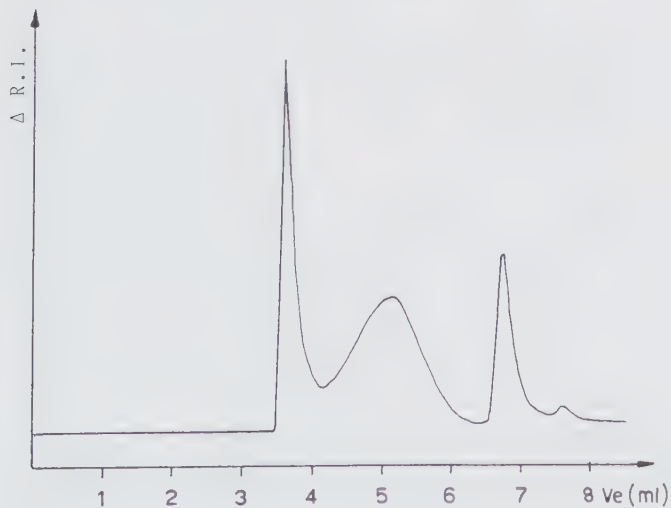


Abb. 4

HP-GPC-Chromatogramm des 1:4 Fällungsproduktes

Säulensystem: μ -Porasil 60 + μ -Bondagel 125

Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH=6,0

Detektion: Refraktometer

HP-GPC-Chromatogramme aus Analysen stammen, die an verschiedenen Säulensystemen durchgeführt wurden, ist ein direkter Vergleich der Chromatogramme nicht möglich.

I.1 Versuche zur Verkürzung des Extraktionsvorganges

Das etwas modifizierte Aufbereitungsverfahren von CALDES und Mitarbeitern (25) ist für die Isolierung von Polysacchariden wegen der notwendigen hohen Alkoholmengen nur im Labormaßstab einsetzbar. Für die Übertragung in den industriellen Maßstab versuchten wir zunächst das Fraktionierungsverfahren durch Alkoholfällungen zu vereinfachen.

Wir beschränkten uns auf eine einzige 1:3 Fällung des filtrierten Mediums, zentrifugierten den Niederschlag ab, nahmen ihn in Wasser auf, zentrifugierten unlösliche Bestandteile ab und unterwarfen die trübe Lösung der 1:1 und 1:4 fraktionierten Ethanol-Fällung. Die abzentrifugierten Niederschläge wurden wieder in Wasser gelöst, dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Die erhaltenen Polysaccharidfraktionen zeigten ziemlich identische HP-GPC-Profile bzw. gleiche Zuckerbestandteile, wie die Polysaccharidgemische, die nach der CALDES-Methode isoliert worden waren. Da auch die 1:1 Fällung im Granulozytentest nach BRANDT (29) eine deutliche phagozytosesteigernde Aktivität aufwies (vergleiche Kapitel II.1.), kann dieses verkürzte Extraktionsverfahren mit der CALDES-Methode als gleichwertig angesehen werden.

Eine weitere Möglichkeit das Verfahren abzukürzen, bestand in einer Konzentrierung des Nährmediums über kontinuierliche Membranfiltration.

Diaflow-Hollow-Fiber (30) sind schlauchförmige, aus synthetischen Polymeren gefertigte Ultrafilter (Innendurchmesser 0,2/0,5/1,1 mm). Wird die schlauchförmige Membran von der Probedurchflüssigkeit durchströmt, treten aufgrund des entstehenden hydrostatischen Druckes Lösungs-

mittel und membranpermeable Substanzen durch die Membran nach außen. Dies führt mit abnehmendem Volumen der Probenflüssigkeit zu einer Konzentrierung an retendierten Molekülen. Dieses Hollow-Fiber-System hat gegenüber einer normalen Diafiltration den Vorteil, daß durch Überströmen der inneren Oberfläche der Hollow-Fiber eine Polarisation abgetrennter Makromoleküle verhindert wird.

Mit Hilfe eines Hollow-Fiber Konzentrators CH 4* ausgerüstet mit Hollow-Fiber-Patronen vom Typ H 1 (nominelle Abtrenngrenze 10000) konnten 4 l Nährlösung in zwei Stunden auf 400 ml eingeeengt werden.

Da die so konzentrierte Nährflüssigkeit wegen der hohen Viskosität nicht direkt auf eine Ionenaustauschersäule gegeben werden konnte, unterwarfen wir die Lösung der unter I.1. beschriebenen Fällungsprozedur. Das auf diese Weise erhaltene 1:1 Fällungsprodukt und daraus gewonnene Einzelkomponenten wiesen allerdings mit ca. 20% einen relativ geringen Gesamtzuckergehalt auf. Außerdem konnte in unseren Testsystemen keine immunstimulierende Aktivität gefunden werden.

Dieses Verfahren der kontinuierlichen Membranfiltration führte also trotz der anschließenden fraktionierten Alkoholfällungen nicht zu Polysaccharidfraktionen, die in der Zusammensetzung mit jenen aus der CALDES-Aufarbeitung identisch waren.

Der Hollow-Fiber-Konzentrator CH 4 und die Hollow-Fiber-Patrone wurden uns freundlicherweise von der Fa. Amicon (Witten) zur Verfügung gestellt.

II. Darstellung der Einzelkomponente EN 1 und weiterer Polysaccharidfraktionen (b-d) aus der 1:1 Fällung

Die klassischen Reinigungsverfahren für Polysaccharidgemische sind fraktionierte Fällungen mit Ethanol (31), Aussalzen mit Fehling'scher Lösung oder BaOH-Lösung (32,33) oder Fraktionierungen mit Cetyltrimethylammoniumbromid (12). Demgegenüber führen Methoden, wie die Gel-filtration, die Anionenaustausch- oder auch Bioaffinitätschromatographie eher zu homogenen Polysacchariden. Nach dem positiven Carbazol-Test (28) waren in beiden Rohfraktionen (s. Tabelle 2), der 1:1 und der 1:4 Fällung, Urnsäuren nachzuweisen. Die Voraussetzung für die Anwendung der Anionenaustauschchromatographie (AIA) zur Trennung von sauren und neutralen Polysacchariden war damit gegeben.

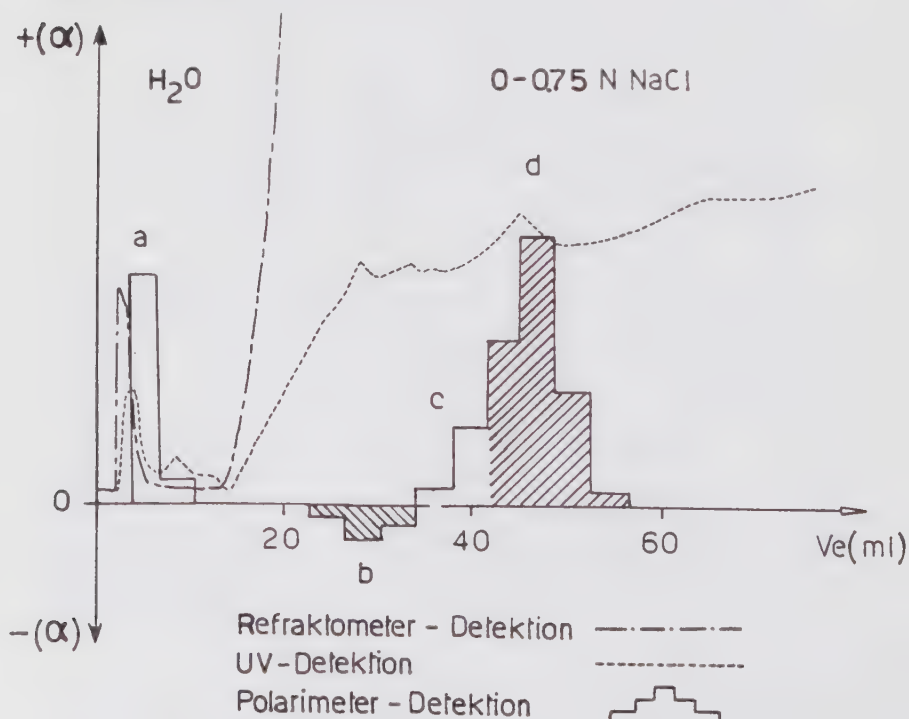


Abb.5 Auftrennung der 1:1 Fällung an DEAE-Sephadex CL-6B

Dazu beschickten wir DEAE-Sepharose CL-6 B in Acetatform mit einer wässrigen Lösung der 1:1 Rohfraktion. Im Wassereluat (a) (Abb.5) wurde ein Neutralpolysaccharid mit positiver optischer Drehung erhalten. Die Elution der sauren Polysaccharidfraktionen erfolgte durch einen 0-0,75 N NaCl-Gradienten. Bei einer Salzkonzentration von 0,2 N wurde ein Polysaccharid mit negativer optischer Aktivität (b) abgelöst, bei einer Salzkonzentration von 0,4 N zwei rechtsdrehende Fraktionen (c,d).

Tabelle 3: Molare Zuckerzusammensetzung der AIA-Fractionen a-d

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: OV 225/T=210°C
Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/100°C/2 h

Zucker	Polysaccharidfraktionen			
	a	b	c	d
Rhamnose	-	Spuren	0,035	0,2
Fucose	0,22	-	-	-
Arabinose	0,05	1,0	1,0	7,8
Xylose	1,0	0,027	0,05	0,5
Mannose	-	-	-	-
Galaktose	0,2	0,6	0,22	1,0
Glucose	0,07	0,013	0,01	

In Tabelle 3 ist die molare Zuckerzusammensetzung der Anionenaustauschfraktionen a-d wiedergegeben. Die Fraktionen b,c und d wiesen als Hauptzuckerkomponenten Arabinose und Galaktose auf, so daß es sich um Arabinogalaktane handeln könnte. Die Fraktion a lieferte unter den in Tabelle 3 angegebenen Hydrolysebedingungen vollständig andere Zuckerbestandteile. Arabinose war hier nur mehr in Spuren vertreten. Dafür konnte neben Glucose und Galaktose als Hauptzuckerkomponente vor allem Xylose identifiziert werden.

Die prozentuellen Mengenverhältnisse der Ionenaustauschfraktionen sind in Tabelle 4 dargestellt. Fraktion a und d machten den Hauptanteil aus, während die Fraktionen b und c in wesentlich geringeren Anteilen vertreten waren.

Tabelle 4 : Prozentuelle Mengenverhältnisse der Fraktionen a-d bezogen auf das 1:1 Fällungsprodukt

	a	b	c	d
ca.	23%	5%	6%	21%

II.1 Immunologisches Screening einzelner Polysaccharidfraktionen

Um in Erfahrung zu bringen, welche Polysaccharidfraktionen die von WAGNER und PROKSCH (8) bei den aus der Pflanze isolierten Polysacchariden gefundene immunstimulierende Wirkung aufwiesen, verwendeten wir den Granulozytentest nach BRANDT (29). Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, konnte bei der 1:1 Rohfraktion, im Vergleich zum 1:4 Fällungsprodukt, eine Steigerung der Phagozytoserate beobachtet werden. Die Ionenaustauschfraktionen a-d zeigten unterschiedlich hohe Phagozytoseraten. So wiesen die Fraktionen a, b und c ziemlich ähnliche Aktivität auf, während d eine um 10% geringere Phagozytoserate hatte. Da die Fraktion a (=EN 1) mengenmäßig den Hauptanteil darstellte und sehr gut wasserlöslich war, entschieden wir uns für die weitere Reinigung dieser Fraktion.

Tabelle 5: Steigerung der Phagozytoserate im Granulozyten=
test nach BRANDT (29)

Polysaccharid= fraktionen	Phagozytosewerte in Prozent bei			
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	mg/ml
1:1 Fällung	21,5%	27,8%	0	
1:4 Fällung	15,4%	18,3%	13,5%	
Fraktion a=EN 1	8,5%	27,5%	16,5%	
Fraktion b	28,2%	14 %	14,5%	
Fraktion c	12,8%	24,4%	26,7%	
Fraktion d	16 %	11 %	10,5%	

II.2. Weitere Reinigung der Neutralfraktion EN 1 über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration.

Zur Abtrennung noch vorhandener saurer Polysaccharid-Anteile unterwarfen wir EN 1 zuerst einer Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacryl CL 6 B und anschließend an DEAE-Trisacryl M. In beiden Fällen verwendeten wir Wasser als Eluens. Die so gereinigte Neutralfraktion EN 1 wurde dann über Sephacryl S 400 gelchromatographiert.

Wie aus Abb.3 ersichtlich, konnten niedermolekulare Bestandteile (V_e=110-130 ml) ohne optische Aktivität vom rechtsdrehenden Polysaccharid (V_e=50-110 ml) abgetrennt werden. Das im präparativen Maßstab gereinigte Polysaccharid EN 1 wurde der Prüfung auf Einheitlichkeit und der Molekulargewichtsbestimmung (s.Abschnitt IV) unterworfen.

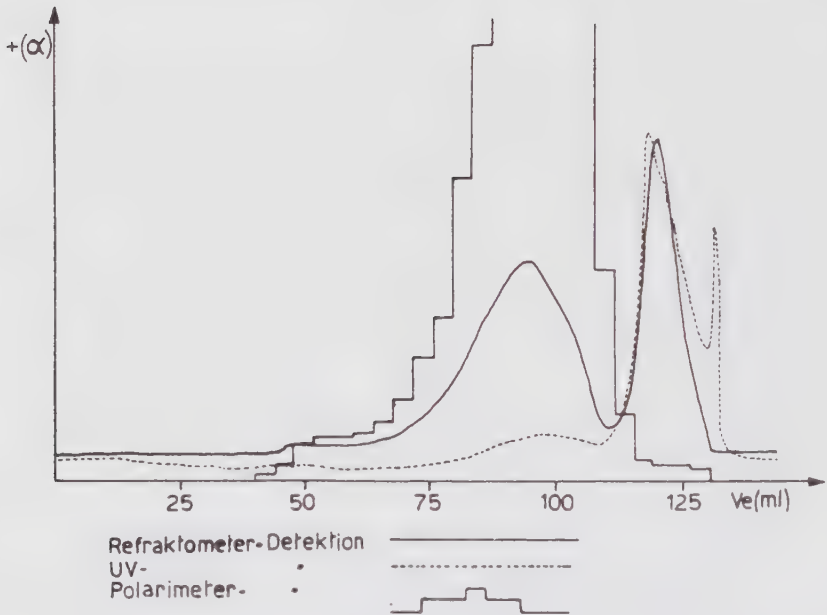


Abb.6

Gelfiltration der Neutralfraktion EN 1 an Sephacryl S 400
Eluens: H₂O

III. Darstellung von Einzelkomponenten (PS EN 1 und AG) aus der 1:4 Fällung

In unserem Arbeitskreis (9,34) hatte sich gezeigt, daß durch entsprechende Aufreinigung aus immunologisch nur mäßig aktiven Polysaccharidgemischen Einzelkomponenten mit relativ guter immunstimulierender Aktivität gewonnen werden konnten. Daher wurde auch die 1:4 Fällung, die gegenüber der 1:1 Fällung um ca. 10% geringere Phagozytoseraten hatte (siehe Tabelle 5), einer genaueren Untersuchung unterworfen. Außerdem war von Interesse, wie sich die von PROKSCH (9) aus der Pflanze gewonnenen Polysaccharide und die aus der 1:4 Fällung isolierten Polysaccharidfraktionen voneinander unterschieden.

III.1 Anionenaustauschchromatographie

Eine orientierend durchgeführte Gelfiltration der 1:4 Fällung deutete auf ein Polysaccharid-Gemisch hin, bestehend aus zwei Fraktionen mit verschiedener optischer Aktivität. Da im Carbazoltest auch hier die Anwesenheit eines relativ hohen Uronsäureanteils festgestellt worden war, kam wiederum die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL 6 B zur Anwendung. Im Vorlauf konnte mit Hilfe des Polarimeters ein Peak A mit positiver optischer Drehung (EN 4) detektiert werden. Bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 N erfolgte die Elution eines sauren Polysaccharides mit negativem Drehsinn (Peak B=PS AG).

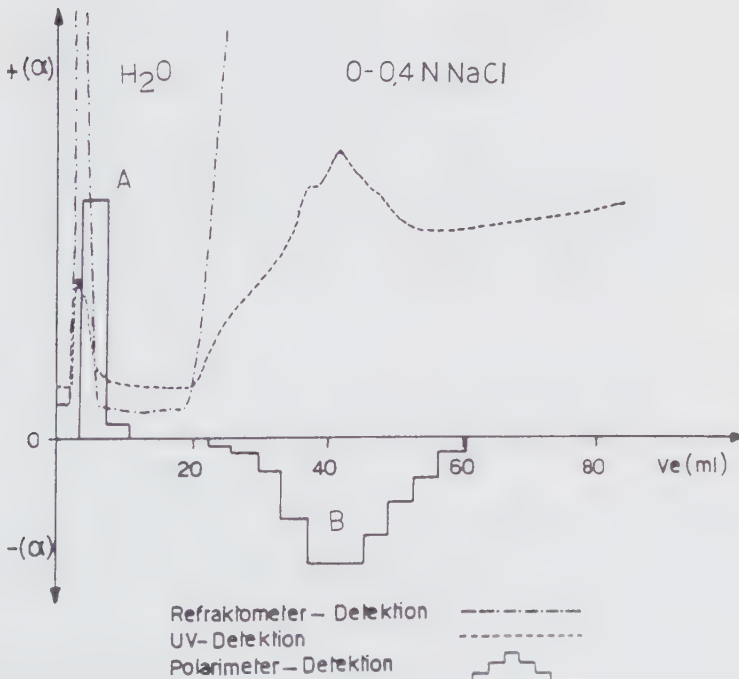


Abb.7

Auftrennung der 1:4 Fällung an DEAE-Sepharose CL 6 B

III.2 Weitere Reinigungsschritte der Polysaccharidfraktionen A(=EN 4) und B(=AG)

Während für das Polysaccharid EN 1 mehrere chromatographische Reinigungsverfahren notwendig waren, konnten die Polysaccharidfraktionen EN 4 und AG relativ einfach in reiner Form gewonnen werden.

Die Neutralfraktion EN 4 wurde über Ultragel AcA 202 mit 0,2 N NaCl-Lösung gelchromatographiert. Das Polysaccharid EN 4 war im Ausschlußvolumen des Gels zu finden, die niedermolekularen Begleitsubstanzen ohne optische Aktivität im Fraktionierungsbereich bzw. Totalvolumen.

Die saure Polysaccharidfraktion AG unterwarfen wir einer zweiten Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M. Im Wassereluat waren nur geringe Substanzmengen zu finden. Das Polysaccharid AG konnte bei einer NaCl-Konzentration von 0,2 N als relativ symmetrischer Peak detektiert werden. Beide Polysaccharide wurden schließlich noch einer Gelfiltration über Sephadex S 400 mit 0,2 N NaCl-Lösung als Elutionsmittel unterworfen. Da wir über UV- und Refraktometerdetektion in beiden Fällen symmetrische Peaks erhielten, wurden die Polysaccharide EN 4 und AG im HP-GPC-System (siehe Kapitel IV) auf ihre Einheitlichkeit überprüft.

IV. Prüfung der Polysaccharide EN 1, EN 4 und AG auf Homogenität und Molekulargewichtsbestimmung

IV.1. HP-GPC-Methode (High Pressure Gel Permeation Chromatography)

Zur Prüfung der Homogenität eines Polysaccharides werden heute hauptsächlich die Elektrophorese (35), die Untersuchung mit der Ultrazentrifuge (36) oder die Gelchromatographie herangezogen. Die Vorteile von gelchromatographischen Verfahren sind die einfache Durchführbarkeit und der relativ geringe apparative Aufwand. Nachteilig sind die hohen Analysenzeiten von mindestens acht Stunden.

Mittlerweile hat man auch die Hochdruckchromatographie auf die Gelchromatographie (Ausschlußchromatographie) übertragen. Da die meisten klassischen Gele nicht oder unzureichend druckstabil sind, mußten für diesen Zweck mechanisch stabile stationäre Phasen entwickelt werden. Die heute im Handel befindlichen stationären Phasen für wässrige HP-GPC sind in Tabelle (5) aufgelistet. Man kann zwei Material-Typen (37) unterscheiden. Der 1. Typ auf Kieselgelbasis enthält Mikropartikel mit modifizierter, hydrophiler Oberfläche, der 2. Typ hat eine organische Gelgrundlage nicht genau definierter Zusammensetzung.

Tabelle 6: Charakteristische Säulenmaterialien für wässrige Ausschlußchromatographie (HP-GPC)

A KIESELGELBASIS

Chemisch veränderte Kieselgeloberflächen	Handelsname
Glycerol-Propyl-Typ	SynChropak GPC LiChrosorb Diol LiChrospher Diol
Polyether-Typ	µ-Bondagel E
Unveröffentliche Struktur	Waters Protein=säulen
Glykol-Ether-Typ	Tsk Gel Typ SW

B ORGANISCHE GELMATERIALIEN

Geltyp	Handelsname
Glykolmetacrylat-Gel Copolymer	Spheron P
Sulfoniertes Polystyrol-Divinyl Benzol Copolymer	Shodex IonPak S
Hydroxyliertes Polyether Copolymerisat (exakte Struktur nicht veröffentlicht)	Tsk Gel Typ PW

Welche Säulenmaterialien zur Anwendung kommen, muß für die jeweilige Problemstellung in einem Vorversuch ermittelt werden. Allen Materialien gemeinsam ist, daß sie Trennungen mit hoher Auflösung gewährleisten und die benötigte Probenmenge pro Analyse im Vergleich zur normalen GPC relativ gering ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Bondagel-Säulen der Fa. Waters eingesetzt. Einige Trennungen von Polysacchariden wurden auch an einer TSK-PW-4000-Säule (Leihgabe der Fa. LKB) durchgeführt. Da Wechselwirkungen zwischen Packungsmaterialien und speziell sauren Polysacchariden wie Ionenausschluß,-einschluß,-austausch und -adsorption niemals auszuschließen sind, setzten wir bei unseren Untersuchungen als Eluens immer Puffersysteme mit einer Molkonzentration $\geq 0,2$ ein.

In den Abb. 8,9,10 sind die Elutionsprofile der Polysaccharide EN 1, EN 4 und AG wiedergegeben. In allen Fällen erhält man bei Refraktometer- und UV-Detektion relativ symmetrische Peaks, so daß eine chemische Einheitlichkeit der Substanzen angenommen werden kann.

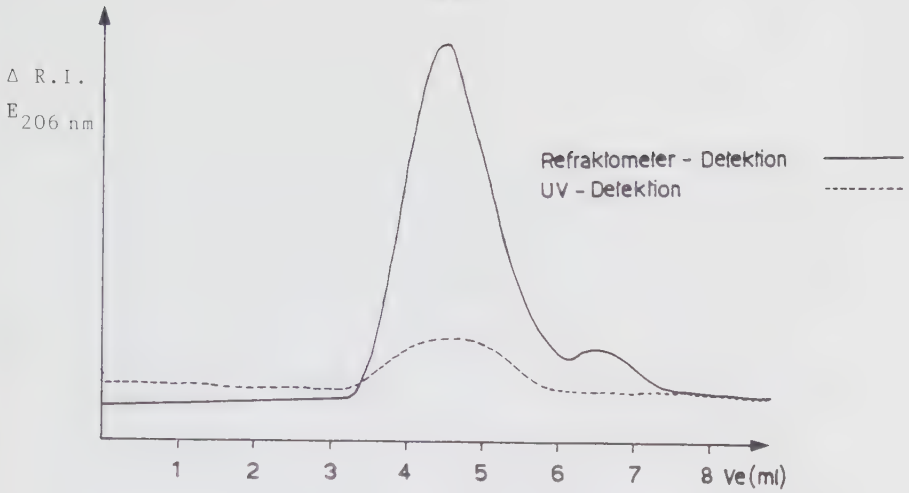


Abb. 8 HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides EN 1
Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500
Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0

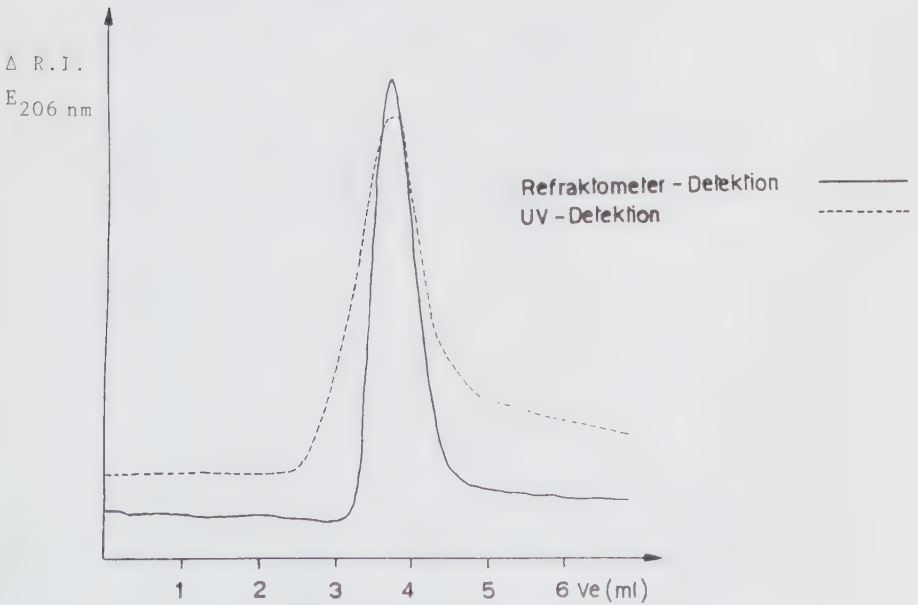


Abb. 9 HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides AG
Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500
Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0

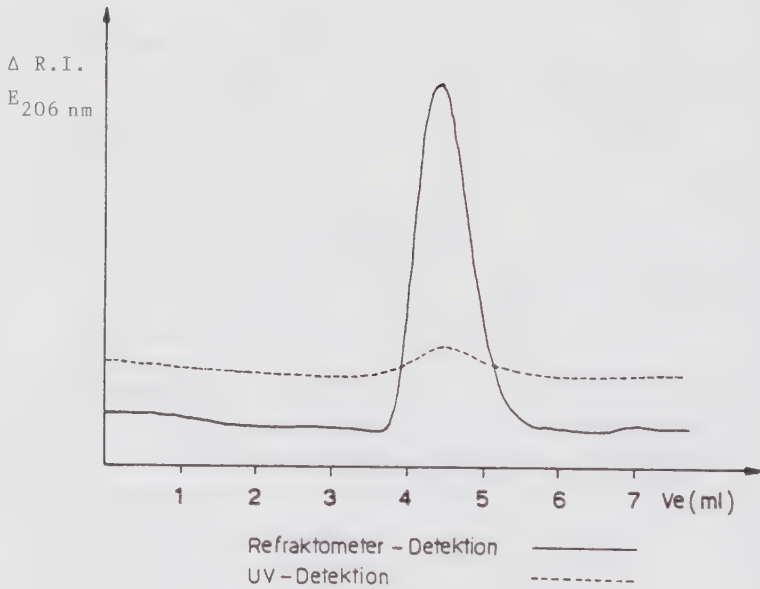


Abb. 10 HP-GPC-Chromatogramm des Polysaccharides EN 4
Säulensystem: μ -Porasil 60 + μ -Bondagel 125
Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0

IV.2. Molekulargewichtsbestimmung

In der Literatur sind zahlreiche physikalische und chemische Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes genannt. Ultrazentrifugation (38), Osmometrie (39) oder die Feststellung der reduzierenden Endzucker (40) sind nur einige davon. Die experimentell ermittelten Werte für die Molekulargewichtsverteilung hängen dabei stark von der eingesetzten Methode und den Versuchsbedingungen ab.

Wir entschieden uns für die Gelchromatographie (HP-GPC). Dieses Verfahren zeichnet sich durch kurze Analysenzeiten, aber auch durch gute Reproduzierbarkeit (41) aus. Eicht man das chromatographische System mit Dextranen verschiedener mittlerer Molekulargewichte, so kann man vom Elutionsvolumen V_e des zu untersuchenden Polysaccharides auf sein mittleres Molekulargewicht schließen (42).

$$(V_e = f(\log \bar{M}))$$

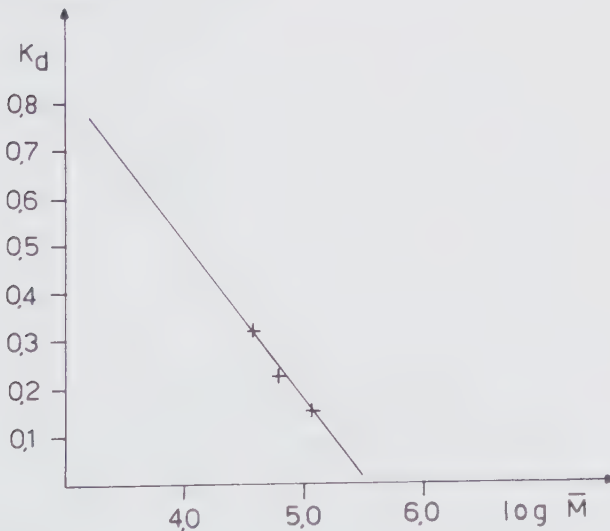


Abb. 11 Eichgerade zur Molekulargewichtsbestimmung von PS EN 1 und PS AG

Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500
Eluentien: 0,2 bzw. 0,5 M Phosphatpuffer pH 6

Die Molekulargewichtsbestimmung der Polysaccharide AG und EN 1 wurde an einem Säulensystem bestehend aus Bondagel 125 und Bondagel 500 durchgeführt. Die Säulen, die nach steigendem Ausschlußvolumen hintereinander geschaltet wurden, besitzen laut Angaben des Herstellers einen Fraktionierungsbereich von 2000-500000 D. Die Eichung erfolgte mit den Dextranen T 2000, T 110, T 70, T 40 und Glucose (Abb.11). Als Elutionsmittel verwendeten wir Phosphatpuffer verschiedener Molarität.

BARTH und REGNIER (41) untersuchten anhand von HP-GPC Analysen den Einfluß der mobilen Phase auf das mittlere Molekulargewicht von Carboxymethylcellulose. Verschiebungen des pH-Wertes brachten nur unwesentliche Änderungen. Erhöhte man aber die Ionenstärke des Eluens, so erfolgte eine Verkleinerung des mittleren Molekulargewichtes von Carboxymethylcellulose. Dieses Phänomen wird mit einer Abnahme des hydrodynamischen Volumens bei höheren Pufferkonzentrationen erklärt. Diese Ergebnisse konnten wir bei unseren Versuchen bestätigen. Während das mittlere Molekulargewicht der Neutralpolysaccharide bei verschiedener Molarität des Eluens praktisch unverändert blieb, konnte man beim sauren PS AG mit zunehmender Phosphat-Konzentration eine deutliche Verringerung des Molekulargewichtes beobachten.

Tabelle 7: Molekulargewichtsbestimmung der Polysaccharide EN 1*, EN 4** und AG*

*Bondagel 125 + Bondagel 500			
**Porasil 60 + Bondagel 125			
PS	Phosphatpuffer (pH=6,0)	0,2 M	0,5 M
EN 1	$\bar{M}$	25000	25000
EN 4	"	10000	10000
AG	"	115000	75000

Für die Molekulargewichtsbestimmung von PS EN 4 benötigten wir ein Säulensystem mit einem niedrigeren Fraktionierungsbereich. Als geeignet erwies sich eine Kombination von Porasil 60 und Bondagel 125. Als einzige Eichsubstanz stand uns Dextran T 10 zur Verfügung, die im linearen Fraktionierungsbereich der Säulen liegt. Das mittlere Molekulargewicht konnte daher nur annähernd mit 10000 angegeben werden.

V. STRUKTURAUFKLÄRUNG DES POLYSACCHARIDES AG

V.1. Zuckeranalyse

Während man früher zur Hydrolyse von Polysacchariden (43) fast ausschließlich Schwefelsäure verwendete, wird heute immer häufiger die Trifluoressigsäure vorgezogen. Sie gewährleistet kurze Reaktionszeiten und hat den großen Vorteil, daß sie wegen ihrer Flüchtigkeit leicht aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden kann. Die Hydrolysebedingungen richten sich nach der Struktur des eingesetzten Polysaccharides. Während Hemicellulosen relativ leicht (44), d.h. schon mit 2 N Trifluoressigsäure, hydrolysiert werden, muß zur Totalhydrolyse von Cellulose konzentrierte Trifluoressigsäure eingesetzt werden. Die Schwierigkeit bei der Hydrolyse von Polysacchariden mit unterschiedlicher Zuckerzusammensetzung liegt darin, eine möglichst große Depolymerisation bei möglichst geringem Verlust an Monosacchariden zu erreichen.

Die Bestimmung der qualitativen Zuckerzusammensetzung erfolgte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Nach Hydrolyse mit 2 N Trifluoressigsäure (2h/100°C) konnten Arabinose und Galaktose als Hauptzucker identifiziert werden. Die beiden Zonen im R_f-Bereich der Uronsäuren konnten nicht zugeordnet werden. Erst nach Anreicherung der sauren Zuckersäure fraktion über Anionenaustauschchromatographie war Galakturonsäure nachzuweisen. Eine Identifizierung der darüberliegenden violetten Zone war nicht möglich. Auszuschließen waren Glucuronsäure, 4-O-Me-Glucuronsäure, Mannuronsäure und Iduronsäure. Möglicherweise handelt es sich um ein Abbauprodukt (45). Zur Bestimmung der molaren Monosaccharidzusammensetzung wurde das hydrolysierte Zuckergemisch in die Alditolacetatform (46) überführt und durch Gaschromatographie analysiert. Galaktose und Arabinose liegen im Verhältnis 1:1 vor. In Spuren sind auch Mannose, Rhamnose und Glucose nachweisbar.

Tabelle 8: Molare Zuckerzusammensetzung des Polysaccharides AG

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: OV 225/T=210°C
Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/2h/100°C

Rhamnose	0,02
Arabinose	1,04
Mannose	0,03
Galaktose	1,0
Glucose	Spuren

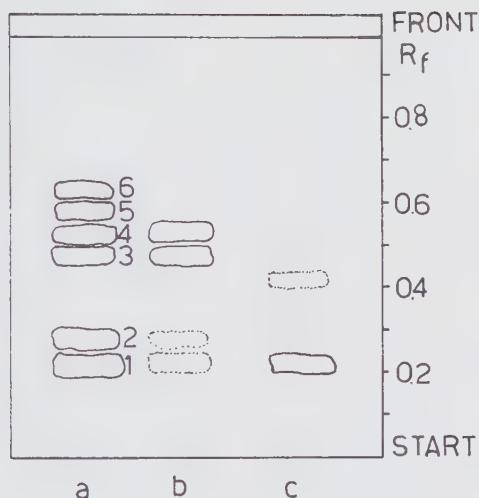


Abb.12

Dünnschichtchromatographie der neutralen und sauren
Fraktion aus dem Hydrolysat von Polysaccharid AG

a=Testgemisch: 1= Galakturonsäure
2= Glucuronsäure
3= Galaktose
4= Arabinose
5= Xylose
6= Rhamnose

b=Neutralfraktion der AG-Hydrolyse

c=Saure Fraktion der AG-Hydrolyse

Laufmittelsystem: n-Butanol:Aceton:Essigsäure:Wasser (35:35:10:20)
Detektion: Diphenylaminophosphorsäure 110°C, 10 min., vis

V.2. Methylierungsanalyse des Polysaccharides AG

Die Methylierungsanalyse ist die älteste, aber sicherlich am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung von Zucker=verknüpfungen in Oligo- und Polysacchariden (47). Dieses Verfahren beruht auf einer vollständigen Veretherung der freien Hydroxylgruppen. Wird das Methylierungsprodukt anschließend hydrolysiert, reduziert und in Alditolacetate überführt, so können die partiell methylierten Alditolacetate über GC-MS identifiziert werden (48). Um ausreichend Nucleophililität gegenüber dem Methylierungsreagenz (meist Methyljodid oder Dimethylsulfat) zu gewährleisten, muß das Polysaccharid in die Alkoxid-Form überführt werden. Nach HAKOMORI (49) erfolgt dies durch Reaktion mit Na-methylsulfinylmethanid in wasserfreiem DMSO. Verwendet man K-methylsulfinylmethanid, so erreicht man einen noch besseren Methylierungsgrad (50). Alternative Verfahren wurden von HAWORTH (51) ($\text{NaOH-Me}_2\text{SO}_4$) und PURDIE (Silberoxid-MeJ) (52) entwickelt. Allerdings wurden diese von der HAKOMORI-Methode zunehmend in den Hintergrund gedrängt.

Die HAKOMORI-Methode ermöglicht in einem einzigen Methylierungsschritt eine vollständige Methylierung. Dies ist besonders bei Uronsäure-haltigen Polysacchariden wichtig, da Uronsäuren bei der Methylierung in die entsprechenden Ester überführt werden. Bei einer eventuell notwendigen Nachmethylierung kann es unter den stark basischen Bedingungen leicht zu einer β -Elimination (53) kommen.

Als Alkylierungsmittel bei Lipopolysacchariden wird neuerdings mit großem Erfolg das hochreaktive Trifluormethansulfonat (Triflat) eingesetzt. Als Lösungsmittel verwendet man 2,6 Di-tert-butylpyridin und Trimethylphosphat (54).

Die vollständige Löslichkeit des Substrates in DMSO ist eine der Grundvoraussetzungen für eine erfolgreiche Methylierung nach der HAKOMORI-Methode. Ist das Substrat in DMSO nur teilweise in Lösung zu bringen, so kommt es zu einer nicht vollständigen Methylierung. Wir führten daher parallel zwei Methylierungsanalysen durch. Einmal setzten wir das Polysaccharid AG in unveränderter Form ein, das andere Mal acetylierten wir das Polysaccharid vor der Methylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin in Formamid (55). Diese Derivatisierung führt in den meisten Fällen zu einem Anstieg der Löslichkeit des Materials in DMSO. Die methylierten Polysaccharide wurden anschließend hydrolysiert, reduziert und acetyliert. Die Identifizierung der erhaltenen

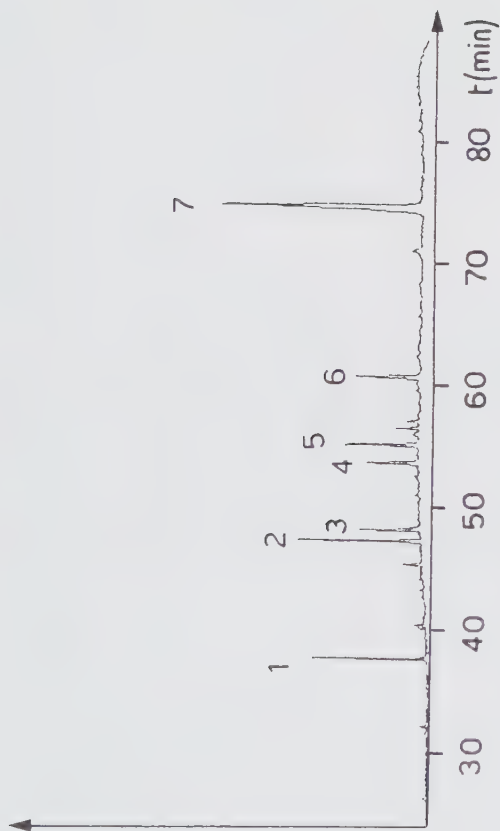


Abb. 13

Ionenchromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate
von Polysaccharid AG

(Quarzkapillare OV 1701, Temperaturprogramm: 100°C bis ca. 240°C
mit 30°C/min.)

Tabelle 9: Methylierungsanalyse des Polysaccharids AG

Peak	molare Zusammensetzung AG	AG*	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke (m/c)
1	1,5	3,7	1,4-Di-O-acetyl-2,3,5-tri-O-methyl-arabinitol	101,117,129,145,161
2	1,4	2,2	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-arabinitol	101,117,129,161,189
3	0,6	0,8	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galaktitol	101,117,129,145,161,205
4	0,7	0,9	1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-2-O-methyl-arabinitol	99,111,117,127,141,159,172
5	0,97	0,7	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-galaktitol	101,117,129,161,173,233,277
6	1,0	1,0	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-galaktitol	99,101,117,129,159,161,173,189,233
7	4,9	4	1,3,5,6-Tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-galaktitol	117,129,189,233

* AG vor der Methylierung acetyliert

Die Werte für die molare Zusammensetzung wurden nach SWEET korrigiert (57)

partiell methylierten Alditolacetate erfolgte über GC-MS. Durch Vergleich der relativen Retentionszeiten und der Massenspektren mit Literaturwerten (56) konnte man die in Tab. 9 wiedergegebene Zuordnung treffen. Mit Ausnahme der terminalen Arabinose brachte die der Methylierung vorangegangene Acetylierung nur geringfügige Änderungen in der molaren Zusammensetzung der partiell methylierten Alditolacetate. Der geringe Gehalt an bestimmbarer terminaler Arabinose beim nicht acetylierten Produkt könnte neben der zu geringen Löslichkeit in DMSO auch auf Verluste bei der Aufarbeitung, z.B. durch zu langes Abdampfen der stark flüchtigen Komponente, zustande gekommen sein (56).

Neben terminaler Arabinose liegen (1→5)- und 1,3,5- verknüpfte Arabinose im Verhältnis 2:1 vor. Galaktose kommt in 4 Bindungsarten vor. Den Hauptanteil stellt 1,3,6-gebundene Galaktose dar. (1→6)- und (1→3)-verknüpfte Galaktose kommen im Verhältnis von ungefähr 2:1 vor. Terminale Galaktose schließlich liegt gegenüber den anders verknüpften Galaktoseresten in etwas geringeren molaren Mengenverhältnissen vor.

Aus den Massenspektren der permethylierten Alditolacetate geht hervor, daß Arabinose in furanosidischer Form und Galaktose ausschließlich in Pyranose-Form vorliegen.

Nach den Ergebnissen der Zucker- und Methylierungsanalyse könnte das Polysaccharid ein Arabinogalaktan mit stark verzweigter Galaktanhauptkette darstellen. Ungefähr 75% der gesamten Galaktose bilden demnach Verzweigungspunkte. Ob die Hauptkette (1→3)- oder (1→6)-Verknüpfungen aufweist, bzw. die Seitenketten aus (1→3)- oder (1→6)-verknüpfter Galaktose bestehen, konnte mit dieser Analyse allein nicht geklärt werden. Der hohe Anteil an terminaler Arabinose läßt vermuten, daß ein Großteil direkt am Verzweigungspunkt der Galaktankette hängt. Die übrige Arabinose bildet wahrscheinlich lange Arabinose-Seitenketten, bestehend aus (1→5)-verknüpfter Arabinose mit Verzweigungen in Position C-3.

V.3. ¹³C-NMR-SPEKTROSKOPIE

Die ¹³C-NMR-Spektroskopie ist eine relativ neue Methode für die Strukturaufklärung von komplexen Molekülen. Die erste Veröffentlichung über Kernresonanz-spektroskopische Untersuchungen eines einfachen Zuckers erschien im Jahre 1969 (58). Seither hat dieses Verfahren in der "Zuckerforschung" überragende Bedeutung erlangt. Die ¹³C-NMR-Spektroskopie wird heute routinemäßig zur Strukturaufklärung von Mono-, Oligo- und Polysacchariden eingesetzt. Gemeinsam mit anderen physikalischen Methoden (59) hat die ¹³C-NMR-Spektroskopie den großen Vorteil, daß sie die Untersuchung von intakten Polymeren zuläßt.

Bis vor kurzem war eine ausreichend gute Löslichkeit der zu untersuchenden Substanz noch Voraussetzung für erfolgreiche ¹³C-NMR-Analysen. Neue Entwicklungen (60) ermöglichen nun auch die Messung von Festsubstanzen, so daß unlösliche Polysaccharide wie die Cellulose kernresonanzspektroskopisch untersucht werden können. Während Spektren von regulären, linearen Polysacchariden relativ einfach interpretierbar sind, gestaltet sich die Interpretation komplex aufgebauter Polysaccharide sehr schwierig. Im nichtanomeren Bereich liegen meist zu viele Signale auf engem Raum vor, die zusätzlich noch aufgrund sehr kurzer Spin-Spin-Relaxationszeiten (T_2) verbreitert sind. Eine gezielte Zuordnung einzelner Bestandteile des Polysaccharides ist hier nur bedingt möglich. Die Interpretation eines ¹³C-NMR-Spektrums von Polysacchariden erfolgt in jedem Fall durch Vergleich mit Spektren methylierter Monosaccharide oder noch besser durch Vergleich mit Spektren von Oligosacchariden ähnlicher oder verwandter Struktur.

Bei Polysaccharid AG erschienen im Bereich der anomeren Kohlenstoffatome vier Signale, von denen zwei nach tieferem Feld verschoben bei 109,46 und 107,79 ppm, zwei im Bereich zwischen 103,7 und 103,4 ppm liegen.

Da aufgrund der Zuckeranalyse bekannt war, daß das Polysaccharid nur aus zwei Neutralzuckern und der Uronsäure besteht, letztere aber im ¹³C-NMR-Spektrum normalerweise nicht sichtbar wird (61), war die Zuordnung der anomeren Kohlenstoffe relativ einfach. Die Tieffeld-verschobenen Signale sind vermutlich der α -gebundenen, furanoiden ketten- bzw. endständigen Arabinose zuzuordnen. Die Signale bei 103,4 und 103,7 ppm entsprechen den anomeren Kohlenstoffatomen der β -Galaktose die in Pyranose-Form vorliegt.

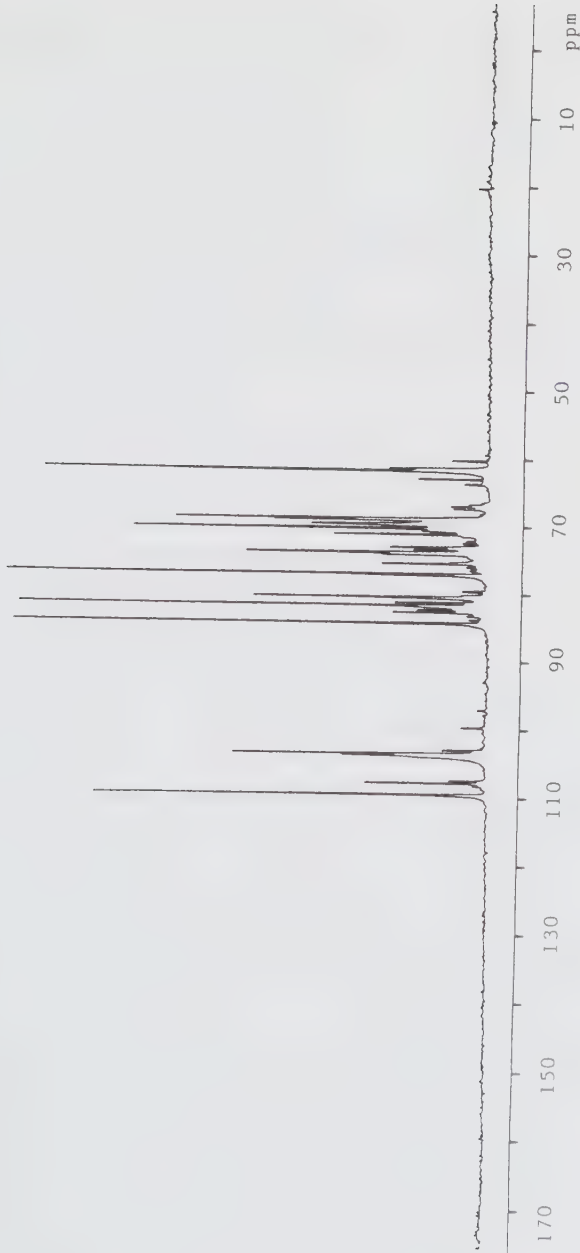


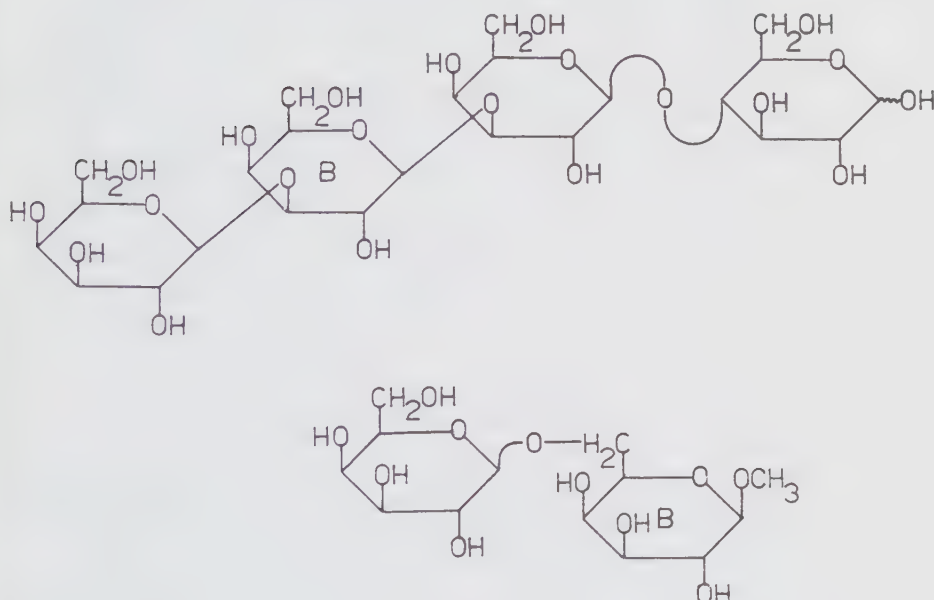
Abb. 14
 ^{13}C -NMR-Spektrum von Polysaccharid AG (50 MHz)-SR-18442,5 Hz

Das C-1-Atom der 1,3,6-verzweigten Galaktose ist gegenüber den Signalen für (1→3)-, (1→6)- und eventuell terminaler Galaktose, die nicht mehr aufgetrennt werden, um ca. 0,5 ppm zu höherem Feld verschoben. Die beiden Signale, d.h. verzweigte Galaktose zur übrigen Galaktose, verhalten sich in ihren Intensitäten wie ca. 1:2, was die Methylierungsergebnisse bestätigt. Zur Interpretation des nichtanomeren Bereiches standen uns ¹³C-NMR-Daten von (1→3)- und (1→6)-β-verknüpften Oligosacchariden zur Verfügung (62,63). Nicht in der Literatur auffindbar waren Spektren einer 1,3,6-β-verknüpften Galaktose, so daß die Zuordnung über die ¹³C-NMR-Daten der oben angeführten Oligosaccharide erfolgen mußte. Ein Vorteil war, daß die verzweigte Galaktose ca. 75% der Gesamthexosen ausmachte. Fünf Signale bei 70,19/ 80,39/ 68,77/ 73,7 und 69,6 ppm mit ähnlich hoher Intensität sind daher wohl den C-Atomen 2,3,4,5 und 6 dieser 1,3,6-verzweigten Galaktose zuzuordnen. Die Resonanz bei 82,29 ppm könnte von der in Position C-3 glykosidierten Galaktose stammen. Die übrigen Signale der (1→3)-β-verknüpften Galaktose dürften für C-2, C-4, C-5 und C-6 bei 70,56/ 68,77/ 75,4 und 61,3 ppm liegen.

In C-3 Stellung methylierte Galaktose führt zu einer großen Tieffeld-Verschiebung des C-4 Wertes um ca. 4,5 ppm (64), was auf die axiale Stellung des β-Substituenten zurückzuführen ist. Bei in Position C-3 glykosidierter Galaktose ist dies offenbar nicht mehr der Fall. COLLINS (62) findet im ¹³C-NMR-Spektrum von 3'-Galaktosyl-Laktose für das C-4 Kohlenstoffatom der Galaktose nur geringe oder überhaupt keine β-Effekte.

Für die (1→6)-verknüpfte Galaktose konnte eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den ¹³C-NMR-Daten von KOVAC (63) für eine (1→6)-verknüpfte Digalaktose festgestellt werden. (siehe Tab.10)

Tabelle 10: ^{13}C -NMR-Daten des Galaktanteiles von Polysaccharid AG im Vergleich mit der 3'',3'-Di-galaktosyl-Lactose nach COLLINS (62) und der (1-6)-Digalaktose nach KOVAC (63)



Substanz	Shiftwerte	Chemische	Verschiebung in ppm				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Tetrasaccharid nach COLLINS (Galaktosylrest B)		104,9	71,1	82,9	69,5	75,9	61,9
(1→3)-verknüpfte Galaktose in Polysaccharid AG	103,71		70,56	82,29	68,77	75,4	61,3
Disaccharid nach KOVAC (Galaktosylrest B)		103,4	70,8	72,8	68,8	73,9	69,0
(1→6)-verzweigte Galaktose in Polysaccharid AG	103,71		71,09	72,97	68,99	74,02	69,6
1,3,6-verknüpfte Galaktose in Polysaccharid AG	103,47		70,19	80,39	68,77	73,7	69,6

Endgruppen von Polysacchariden sind normalerweise aufgrund größerer Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 und somit geringerer Intensitäten schwieriger zu identifizieren als anders verknüpfte Zucker. Wenn eine terminale Galaktose vorliegt, so werden ihre Resonanzen wahrscheinlich von den Signalen der (1 $\rightarrow$ 3)-, (1 $\rightarrow$ 6)- oder 1,3,6 verknüpften Galaktose überlappt.

Die Zuordnung der Arabinose erfolgte durch Vergleich mit ^{13}C -NMR-Daten von Methyl- α -L-arabino-furanosid (65) und verzweigten Arabinanen (66). Das Verhältnis der anomeren Kohlenstoffe von terminaler Arabinose zu kettenständiger bzw. verzweigter Arabinose ist ca. 3:1. Dies steht im Gegensatz zur Methylierungsanalyse, wo Verhältnisanteile von 1:1 bzw. 2:1 bestimmt wurden. Die Ursache für den Verlust an terminaler Arabinose bei der Methylierungsanalyse ist wohl auf die große Flüchtigkeit (57) dieser Komponente zurückzuführen. Da die Kohlenstoffatome der terminalen Arabinose die fünf intensivsten Signale im ganzen ^{13}C -NMR-Spektrum darstellen, war die Zuordnung eindeutig. Mangelnde Übereinstimmung mit der Modellverbindung konnten wir nur für die kettenständige Arabinose finden. Der C-1-Wert bei 107,79 ppm bestätigt auch hier die α -Konfiguration. Die Resonanz bei 81,2 ppm könnte dem C-2-Atom zuzurechnen sein. Die Resonanz bei 76,96 ppm für das C-3-Atom überschneidet sich mit dem entsprechenden Signal der terminalen Arabinose, während das Signal bei 82,65 ppm einem C-4-Atom der (1 $\rightarrow$ 5)-verknüpften Arabinose entsprechen dürfte. Nicht zuzuordnen war das C-5-Atom. 1,3,5-verknüpfte Arabinose als Bestandteil einer Arabinankette konnte wegen des geringen Gehaltes im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht identifiziert werden.

Tabelle 11: Vergleich der chemischen Verschiebungen des Arabinanteils von PS AG mit den ^{13}C -NMR-Daten von Methyl- α -L-arabinofuranosid (65) und Arabinanen nach CAPEK (66)

Substanz	Shiftwert	Chemische Verschiebung in ppm				
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
Methyl- α -L-arabino-furanosid (65)		109,5	82,0	77,9	84,8	62,5
Terminale Arabi=nose (PS AG)		109,46	81,62	76,96	84,56	61,67
(1 $\rightarrow$ 5)-verknüpfte Arabinose (CAPEK)		108,15	82,2	77,8	83,4	67,65*
(1 $\rightarrow$ 5)-verknüpfte Arabinose (PS AG)		107,79	81,2	76,96	82,65	-

* nicht eindeutig zugeordnet

V.4. Partialhydrolyse von Polysaccharid AG

Die einzelnen glykosidischen Bindungen von Heteropolysacchariden werden meist mit unterschiedlicher Geschwindigkeit hydrolysiert. So sind α -verknüpfte Zucker leichter zu hydrolysieren als β -verknüpfte. (1 $\rightarrow$ 6)-Bindungen sind resistenter als andere Bindungsarten. Furanose-Zucker werden um den Faktor 10-1000 schneller abgespalten als entsprechende Pyranosen. Uronsäure-haltige Polysaccharide (45) sind meistens nur bis zu Aldobiuronsäuren abbaubar. Nehmen leicht spaltbare Zuckerbestandteile in Polysacchariden, wie die furanosidisch vorliegende Arabinose (67) im Polysaccharid AG, terminale oder ähnliche Positionen ein, so lassen sich diese unter milden Hydrolysebedingungen meistens vollständig abtrennen, ohne daß der Polysaccharid-Grundkörper zu stark verändert wird. Solche unterschiedlichen Eigenschaften werden zur gezielten Depolymerisation von Polysacchariden ausgenutzt.

Nach der Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen hydrolysierten wir 90 mg Polysaccharid AG in 5 ml 0,05 N Trifluoressigsäure bei 100°C. Nach zwei Stunden brachen wir die Hydrolyse ab, rotierten die Säure ab und untersuchten das Gemisch dünnschichtchromatographisch auf vorliegende Mono-bzw. Oligosaccharide. Neben Arabinose, die natürlich den Hauptanteil darstellte, konnten auch Spuren von Galaktose und einige Di- und Trisaccharide, allerdings nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Zur Abtrennung dieser niedermolekularen Bestandteile wurde das Hydrolysegemisch erschöpfend gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Eine Totalhydrolyse des so gewonnenen Partialhydrolysates (AGP) zeigte die in Tabelle 12 angegebene Zuckerszusammensetzung.

Tabelle 12 : Molare Zuckerszusammensetzung des partiellen Hydrolyseproduktes AGP

Bestimmung durch den Zuckeranalysator/Orcin-Schwefelsäure Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/1,5h/121°C

Rhamnose	0,02
Arabinose	0,007
Mannose	0,01
Galaktose	1,0
Glucose	0,01
Uronsäuren *	ca. 25 %

* Uronsäure-Gehalt in Prozent bestimmt über den Carbazol-Test (28)

V.5. Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes AGP

Die Methylierung erfolgte wiederum nach der Methode nach HAKOMORI. Nach der Hydrolyse wurden die partiell methylierten Zuckerbestandteile reduziert und acetyliert. Die Identifizierung erfolgte über GC-MS und durch Vergleich der relativen Retentionszeiten mit Literaturwerten. Die molaren Verhältnisse der partiell methylierten Zucker sind in Tabelle 13 dargestellt. Gegenüber dem Nativpolysaccharid ergaben sich für den Galaktoseteil folgende molare Verhältnisse:

Starke Zunahme der (1→6)-verknüpften Galaktose (Peak 6), Abnahme der 1,3,6-verzweigten Galaktose (Peak 8), Zunahme der terminalen Galaktose (Peak 2).

Während im Nativ-Polysaccharid das Verhältnis zwischen (1→6)-und (1→3)-verknüpfter Galaktose 1:1 war, betrug das Verhältnis beim Partialhydrolysat AGP 2,5:1. Diese Zunahme der (1→6)-gebundenen Galaktose, die mit der Abnahme an verzweigter Galaktose korrelierte, kann man auf die Abspaltung von terminaler Arabinose in C-3 Stellung zurückführen. Das molare Verhältnis von (1→3)-gebundener Galaktose (Peak 4) im Nativpolysaccharid AG wurde durch die partielle Hydrolyse nicht verändert.

Tabelle 13 : Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes AGP

*	molare Zusammensetzung	Alditolacetate
Peak 2	0,37	1,5 Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galaktitol
Peak 4	0,41	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-galaktitol
Peak 6	1,0	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-galaktitol
Peak 8	0,37	1,3,5,6-Tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-galaktitol

* Peakzuordnung siehe Abb. 18

V.6. ^{13}C -NMR-Spektroskopie des partiellen Hydrolysepro=
duktes AGP

Im anomeren Bereich erscheinen zwischen 104,18 und 104,54 ppm drei Signale, die dem C-1-Kohlenstoffatom von β -gebundener Galaktose zuzurechnen sind. Wegen der ziemlich schlechten Auflösung dieser Signale ist hieraus nicht ohne weiteres auf die Verknüpfungsart der Galaktose zu schließen. Die am weitesten Tieffeld-verschobene Resonanz entspricht vermutlich dem C-1-Atom der terminalen Galaktose, während das intensivste Signal in diesem Bereich von dem C-1-Atom der (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Galaktose stammen könnte. Vergleicht man die übrigen Verschiebungen mit den ^{13}C -NMR-Daten der auf Seite 37 angeführten Oligosaccharide von COLLINS und KOVAC (62,63), so kann man eine relativ gute Übereinstimmung feststellen.

Tabelle 14: ^{13}C -NMR-Daten des partiellen Hydrolysepro= duktes AGP im Vergleich mit zwei Oligo= sacchariden nach COLLINS und KOVAC (s.Seite 37)

Substanz	Shiftwerte	Chemische Verschiebungen in ppm					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Tetrasaccharid nach COL= LINS (Galaktosylrest B)		104,8	71,1	82,8	69,5	75,9	61,8
(1 $\rightarrow$ 3)-verknüpfte Galakto= se in Polysaccharid AGP		104,4	71,08	82,66	69,48	75,88	61,78
Disaccharid nach KOVAC (Galaktosylrest B)		103,4	70,8	72,8	68,8	73,90	69,00
(1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfte Galakto= se in Polysaccharid AGP		104,18	71,58	73,48	69,48	74,55	70,11
Methyl- β -D-galakto= pyranosid SHASKOV (58)		103,4	70,8	72,8	68,8	75,3	61,1
Terminale Galaktose in Polysaccharid AGP		104,54	71,58	73,48	69,48	75,88	61,78
1,3,6-verknüpfte Galaktose in Polysaccharid AGP		104,18	71,08	82,47	69,48	74,55	79,11

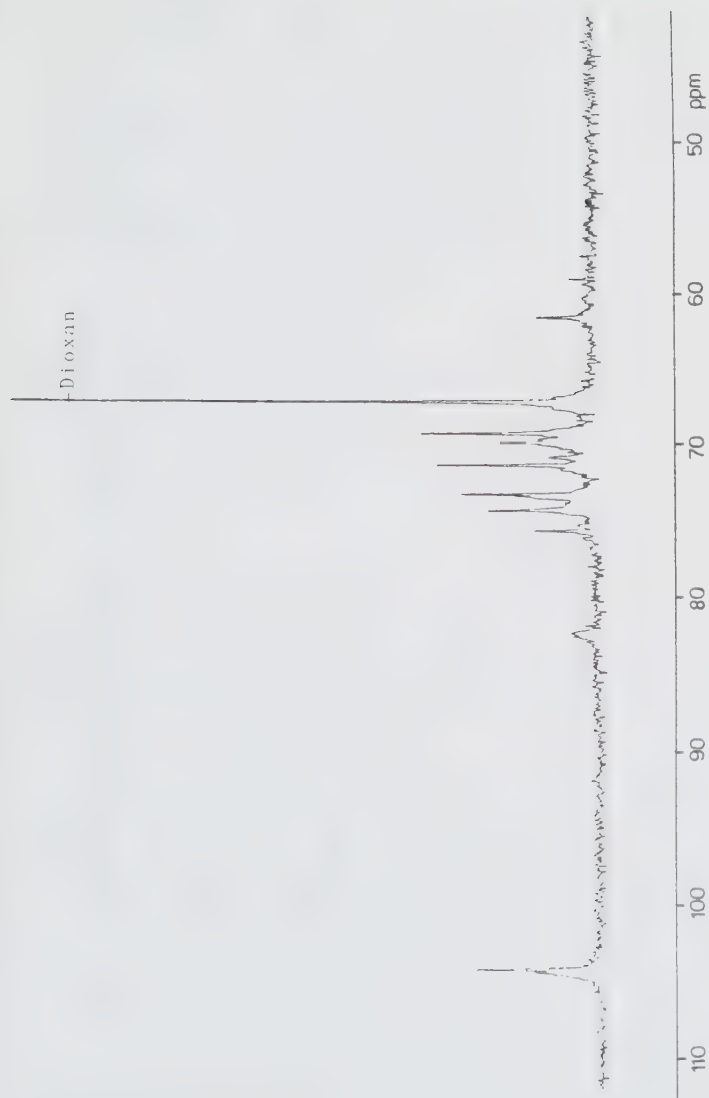


Abb. 15

^{13}C -NMR-Spektrum des partiellen Hydrolyseproduktes ACP (Referenz: Dioxan 67,3 ppm)

Bei den ziemlich verbreiterten Signalen bei 82,66 und 82,47 ppm könnte es sich demnach um die C-3-Atome der (1→3)-verknüpften Galaktoseeinheiten bzw. - um ca. 0,2 ppm zu höherem Feld verschoben - um jene der 1,3,6 gebundenen Galaktose handeln. Diese Verbreiterung der Resonanzen der C-3-Kohlenstoffatome von in C-3 Stellung glykosidierter Galaktose wird auch von KARACSONY (68) beschrieben. Er führt dieses Phänomen auf unterschiedliche Beweglichkeit der Galaktosereste in Abhängigkeit von der Kettenlänge des Oligo-oder Polysaccharides zurück. Man kann also annehmen, daß die (1→3)-verknüpfte Galaktose Bestandteil von längeren Kettenverbänden ist. Daraus kann man folgern, daß die Hauptkette des Polysaccharides AG von (1→3)-verknüpfter Galaktose gebildet wird.

V.7. Identifizierung der Uronsäure aus dem partiellen Hydrolyseprodukt AGP

Zur sichereren Identifizierung der Uronsäuren werden in der Literatur in erster Linie zwei gaschromatographische Methoden beschrieben. Die dazu notwendige Derivatisierung erfolgt entweder über die Herstellung von Trimethylsilylderivaten (69), oder nach Reduktion in Form der Alditolacetate (46).

Wir entschieden uns für die zweite Methode nach JONES und ALBERSHEIM (63). Dazu hydrolysierten wir das Partialhydrolysat 2 h mit 2 N Trifluoressigsäure bei 121°C in zugeschmolzenen Ampullen, rotierten dann die Säure ab und trennten die Uronsäuren über Anionenaustauschchromatographie von den Neutralzuckern ab. Die " saure " Fraktion wurde dann durch dreimalige Reduktion mit NaBD₄ quantitativ reduziert. Die Wiederholung der Reduktion war deshalb notwendig, da bei einmaliger Reduktion die Galakturonsäure nur in das Aldonolacton überführt wird, das bei der anschließenden Behandlung mit Essigsäureanhydrid leicht dehydratisiert.

Nach der Acetylierung mit Essigsäureanhydrid/Pyridin wurde das aus Uronsäure gebildete Alditolacetat über GC-MS identifiziert. Wie aus Abb. 16 ersichtlich, zeigen charakteristische Massenfragmente von m/e 146, 147, 218 und 219 einen Deuteriumeinbau in Position C-1 und C-6 der als Galaktose identifizierten Hexose. Da in C-6 Stellung zwei Mol Deuterium/D nachweisbar waren, konnte die Galaktose nur von einer reduzierten Galakturonsäure stammen.

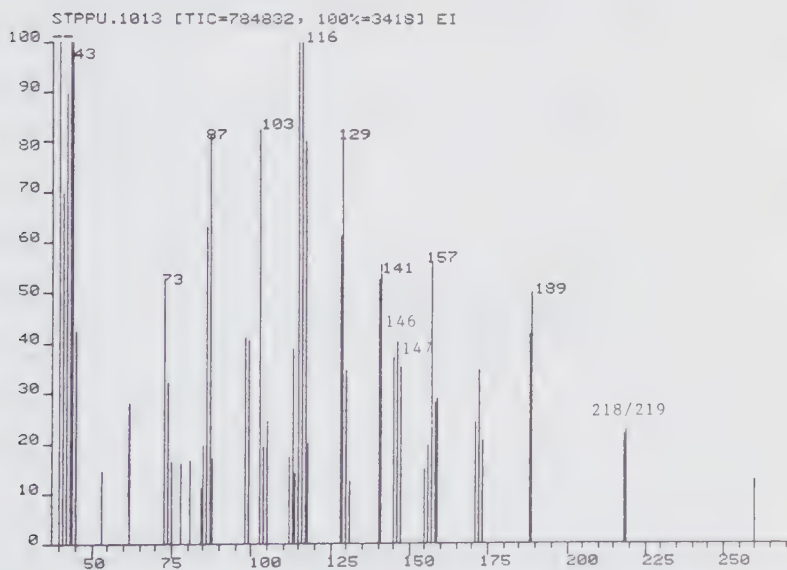


Abb.16

Massenspektrum des durch NaBD_4 -Reduktion aus Galakturon=säure erhaltenen Galaktitol-hexaacetates

V.8. Bestimmung der Bindungsverhältnisse der Uronsäure

Beide Polysaccharide, das Arabinogalaktan AG und das Partialhydrolysat AGP, wurden in 0,2 N Acetatpuffer pH 5,0 (1 mg Substanz in 200 µl Puffer) gelöst und mit 5 µl Pektinase versetzt. Nach einer Inkubation von 24 h bei 25°C wurde das Hydrolysegemisch dünn= schicht= chromatographisch untersucht. Wie aus Abb. 14 hervor= geht, konnten im mittleren Rf-Bereich die Neutralzucker und im unteren Bereich Galakturonsäure detektiert werden. Da Pektinase relativ spezifisch α -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfte Galakturonsäure abspaltet (71), kann angenommen werden, daß die Galakturonsäure in unserem Polysaccharid in derselben Bindungsform auftritt.

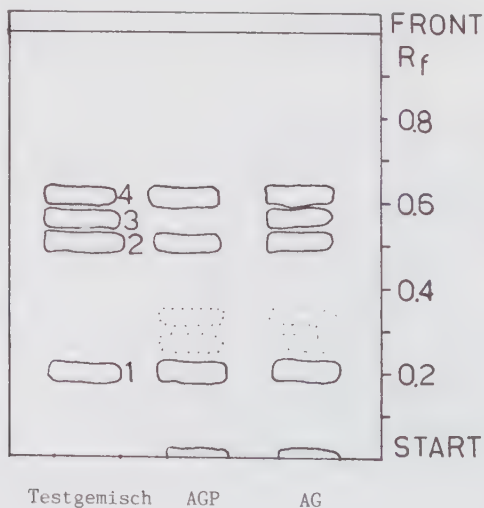


Abb.17 Dünnschichtchromatogramm der Pektinase-behandelten Polysaccharide AG und AGP

Laufmittelsystem: n-Butanol-Aceton-Essigsäure-Wasser (35:35:10:20)

Detektion: Diphenylaminophosphorsäure 110°C, 10 min, vis
 Testgemisch: 1= Galakturonsäure 3= Arabinose
 2= Galaktose 4= Rhamnose

V.9. Reduktion des methylierten Hydrolyseproduktes AGP
mit LiAlD₄

Eindeutige Hinweise, wie die Galakturonsäure im Molekül verknüpft ist, kann man durch Reduktion des Hydrolyseproduktes AGP mittels LiAlD₄ (72) erhalten. Dazu wurde methyliertes AGP in wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst, LiAlD₄ zugegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das reduzierte methylierte Polysaccharid wurde dann hydrolysiert, mit NaBH₄ reduziert und acetyliert. Die partiell methylierten Zucker wurden über GC-MS (Abb.18) identifiziert. Gegenüber dem " einfachen " Methylierungsprodukt (Seite 41) waren vier neue Peaks zu beobachten. Unter Zuhilfenahme der relativen Retentionszeiten, waren Peak 1 und 3 einer kettenständigen bzw. verzweigten Rhamnose zuzuordnen, während Peak 7 als 1,4,6-verknüpfte Galaktose identifiziert wurde. Das Massenspektrum dieser Verbindung zeigt relativ charakteristische Bruchstücke von m/e 263 und 203, die auf eine Deuterierung der Position C-6 hindeuten und dadurch die Abstammung von (1→4)-verknüpfter Galakturonsäure bestätigen.

Da sich (1→2)- und 1,2,4-verknüpfte Rhamnose erst nach der Reduktion mit LiAlD₄ nachweisen lassen, bildet Rhamnose wahrscheinlich Bindungsglieder in einer Galakturonsäurekette, die erst nach der Reduktion der Galakturonsäure von dieser abspaltbar sind (45). Die 1,2,4 - gebundenen Rhamnoseeinheiten könnten einen Verzweigungspunkt zum Arabinogalaktanteil darstellen. Peak 5 konnte nicht zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich um ein Artefakt. Peak 2,4,6 und 8 sind auf das Galaktosegrundgerüst zurückzuführen und entsprechen terminaler, (1→3) -, und 1,3,6-verknüpfter Galaktose.

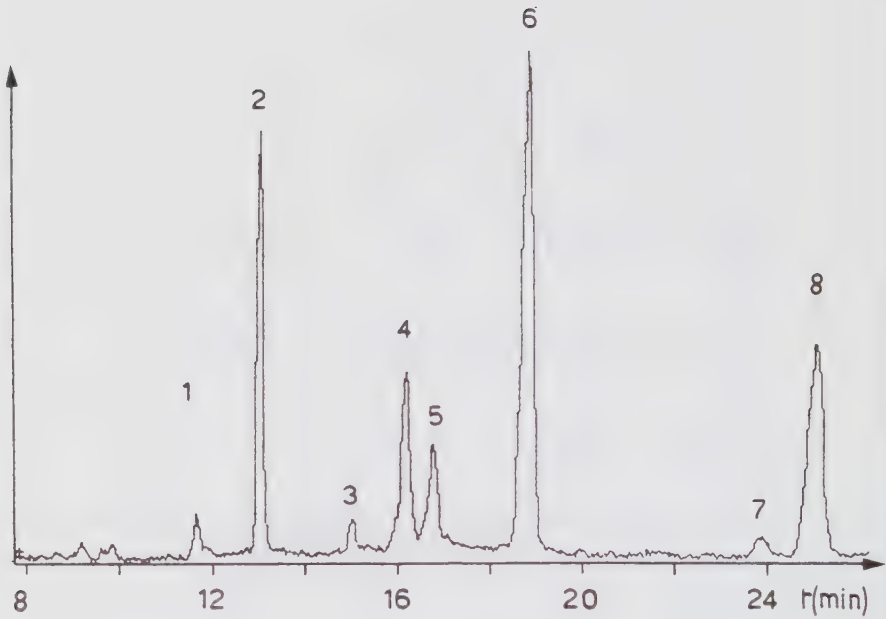


Abb. 18

Ionenchromatogramm der partiell methylierten Alditol=
acetate des carboxylreduzierten AG-Partialhydrolysates (AGP)
(OV 225-Kapillarsäule/Temperaturprogramm: 150°C bis 210°C mit
6°C/min)

Tabelle 15: Methylierungsanalyse des partiellen Hydrolyseproduktes AGP

Peak	molare Zusammensetzung#	Alditolacetate	Charakteristische Bruchstücke m/e
1	*	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-rhamnitol	89, 99, 101, 129, 131, 189 253
2	0,37	1,5 Di-O-acetyl-2,3,4,6 tetra-O-methyl-galaktitol	101, 117, 129, 145, 161, 205
3	5	1,2,4,5 Tetra-O-acetyl-3-O-methyl-rhamnitol	87, 101, 129, 143, 189, 203
4	0,41	1,3,5-Tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-galaktitol	101, 117, 129, 161, 173, 233, 277
5		nicht zuzuordnen	
6	1,0	1,5,6-Tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-galaktitol	99, 101, 117, 129, 159, 161, 173, 189, 233
7	0,23	1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 161, 203, 263
8	0,37	1,3,5,6 Tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 189, 233

* nicht integriert

Die Werte für die molare Zusammensetzung wurden nach SWEET (57)

korrigiert

V.10. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach den durchgeführten Analysen sollte es sich bei Polysaccharid AG um ein Arabinogalaktan handeln, das vermutlich über Rhamnose mit einem Galakturonan verknüpft ist.

Arabinogalaktanteil:

Methylierungsanalysen und ^{13}C -NMR-Spektroskopie des Nativpolysaccharides und des entsprechenden Partialhydrolyseproduktes lassen für den Arabinogalaktanteil eine (1 $\rightarrow$ 3)- β -verknüpfte Galaktose-Hauptkette postulieren. Jede zweite Galaktose-Einheit sollte über C-6 verzweigt sein. Die Seitenketten sind wahrscheinlich aus (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpfter Galaktose (7 bis 8 Zuckereinheiten) aufgebaut. In Position C-3 weisen diese Seitenketten zahlreiche Verknüpfungspunkte zu terminaler Arabinose auf.

Der in Abb.19 dargestellte Strukturvorschlag ist einer von mehreren möglichen Alternativen.

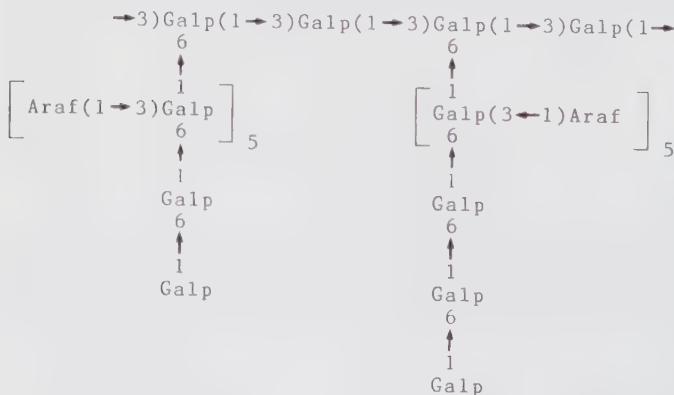


Abb. 19

Galakturonanteil:

Der enzymatische Abbau mit Pektinase und die Reduktion des AG-Partialhydrolyseproduktes mit LiAlD₄ beweisen das Vorhandensein von α -(1 $\rightarrow$ 4)-gebundener Galakturonsäure mit einzelnen (1 $\rightarrow$ 2)-verknüpften Rhamnose-Einheiten. Da bei der Methylierungsanalyse des AG-Partialhydrolyseproduktes auch 1,2,4-verknüpfte Rhamnose nachgewiesen werden konnte, bildet die Rhamnose wahrscheinlich Bindungsglieder zum neutralen Arabinogalaktanteil. Wo die Bindungsstelle beim Arabinogalaktan liegt, konnte nicht festgestellt werden.

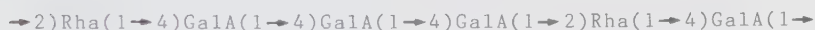


Abb. 20

Strukturvorschlag für das Rhamnogalakturonan

Arabinanteil:

Aufgrund der ¹³C-NMR-Daten müßten zusätzlich zum Arabinogalaktanteil und dem Galakturonanteil noch einzelne stark vernetzte Arabinanketten vorliegen. Sie sollten aus (1 $\rightarrow$ 5)-verknüpften Arabinoseresten bestehen, die zu einem Drittel in Position C-3 verzweigt sind. Ob dieser Arabinanteil mit dem Arabinogalaktanteil oder dem Rhamnogalakturonanteil verbunden ist, konnte nicht geklärt werden. Folgender Strukturvorschlag kann gemacht werden:

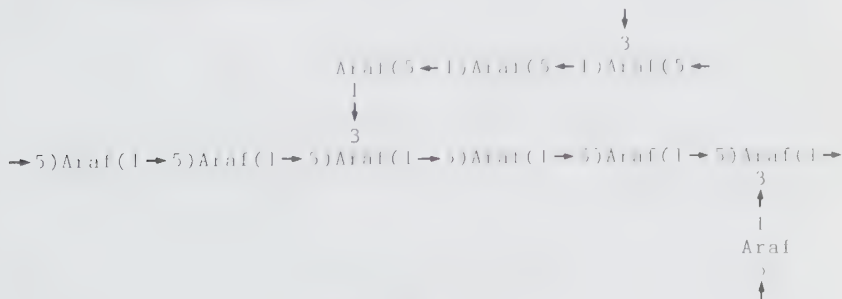


Abb. 21

Das vorliegende Polysaccharid AG ist demnach in die Reihe der Arabino-3, 6-galaktane einzuordnen, die kovalente Bindungen zu Rhamnogalakturonanen besitzen. Ähnliche Polysaccharid-Komplexe wurden bereits aus *Panax Gingseng* (73), *Zostera marina* (74,75), *Hibiscus ficulneus* (76) und aus *Viscum album* L. (77) isoliert. Während beim *Zostera*-Pektin die Seitenketten über Galakturonsäurereste mit einem Galakturonan verbunden sind, werden die Verknüpfungspunkte im *Panax*-Pektin von Rhamnoseresten dargestellt. Ebenfalls über Rhamnose mit einer α -(1 $\rightarrow$ 4)-Galakturonsäure-Hauptkette verknüpft, ist der neutrale Arabinogalaktanteil des erwähnten Mistelpolysaccharides. Im Gegensatz zu unserem Polysaccharid AG baut sich hier das Arabinogalaktangrundgerüst ausschließlich aus β -(1 $\rightarrow$ 6) Galaktoseketten auf. Zwischen unserem Polysaccharid AG und einem Arabinorhamnogalaktan, das von PROKSCH (9) aus der *Echinacea purpurea* Droge isoliert worden war, kann man nur geringe strukturelle Gemeinsamkeiten finden.

Die Hauptkette des von PROKSCH isolierten Arabinorhamnogalaktans wird aus Galaktose und Rhamnose im Verhältnis 1:1 gebildet. Die Rhamnose stellt gleichzeitig auch die Verzweigungspunkte zu relativ heterogen aufgebauten Seitenketten dar. Der saure Charakter des Polysaccharides konnte auf Glucuronsäurereste die in Hauptkette und Seitenkette vorzufinden sind, zurückgeführt werden.

VI. STRUKTURAUFKLÄRUNG VON POLYSACCHARID EN 1 UND EN 4

VI.1. Bestimmung der Zuckerkomponenten

Zur Bestimmung der Zuckerzusammensetzung wurden die bei= den Polysaccharide EN 1 und EN 4 in 2 N Trifluoressig= säure gelöst und 90 Minuten bei 121°C in eingeschmolzenen Ampullen hydrolysiert. Unter diesen drastischen Be= dingungen ist es möglich, auch (1→4)-β-Glucosyl- Bindungen quantitativ zu spalten. Eine orientierend durchgeführte Dünnschichtchromatographie zeigte Fucose, Xylose, Galaktose und Glucose als Neutralzuckerbestand= teile. Im Uronsäurebereich waren keine Flecken detek= tierbar. Zur Ermittlung der molaren Verhältnisse wurden die Zucker in die Alditolacetat-Form überführt und gaschromatographisch bestimmt.

Tabelle 16: Molare Zuckerzusammensetzung der Poly= saccharide EN 1 und EN 4

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC,Säule:
SP 2330,T=225°C

Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/1,5h/121°C

Zucker	PS	EN 1	PS	EN 4
Fucose		0,1		0,1
Arabinose		Spuren		Spuren
Xylose		1,0		1,0
Mannose		Spuren		Spuren
Galaktose		0,27		0,4
Glucose		1,5		1,6

Wie aus Tabelle 16 ersichtlich, haben die Polysaccha= ride EN 1 und EN 4 eine fast identische Zuckerzusammen= setzung.

VI.2. Elementaranalyse und Proteinbestimmung nach LOWRY (78)

Die Elementaranalyse ergab für beide Polysaccharide nur geringe Stickstoffgehalte, so daß nennenswerte Mengen an Proteinen oder Aminosackern ausgeschlossen werden können. Eine parallel durchgeführte Proteinbestimmung nach LOWRY bestätigte dies.

Tabelle 17: Elementar-Analyse der Polysaccharide EN 1 und EN 4

	C (%)	H (%)	N (%)
PS EN 1	41,5	5,8	0,16
PS EN 4	41,6	5,9	0,24

VI.3. Methylierungsanalysen von PS EN 1 und PS EN 4

Die Methylierungsanalyse wurde nach der HAKOMORI-Methode durchgeführt. Beide Polysaccharide waren in DMSO gut löslich, so daß auf eine vorhergehende Acetylierung verzichtet werden konnte. Nach 12-stündiger Behandlung mit Natrium-methyl-sulfinylmethanid wurden die Substanzen mit Methyljodid umgesetzt. Die vollständig methylierten Polysaccharide wurden anschließend hydrolysiert und die Hydrolysespaltprodukte reduziert. Zur Kennzeichnung von C-1 Atomen erfolgte die Reduktion einer Probe mit NaBH_4 und einer zweiten Probe mit NaBD_4 . Die partiell methylierten Alditole wurden dann acetyliert und über GC-MS identifiziert.

Die Gaschromatogramme der methylierten Alditolacetatgemische beider Polysaccharide sind, wie aus Abb.22 hervorgeht nahezu deckungsgleich. Insgesamt konnten sieben Hauptverbindungen detektiert werden. Ihre molaren Verhältnisse und charakteristischen MS-Bruchstücke sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

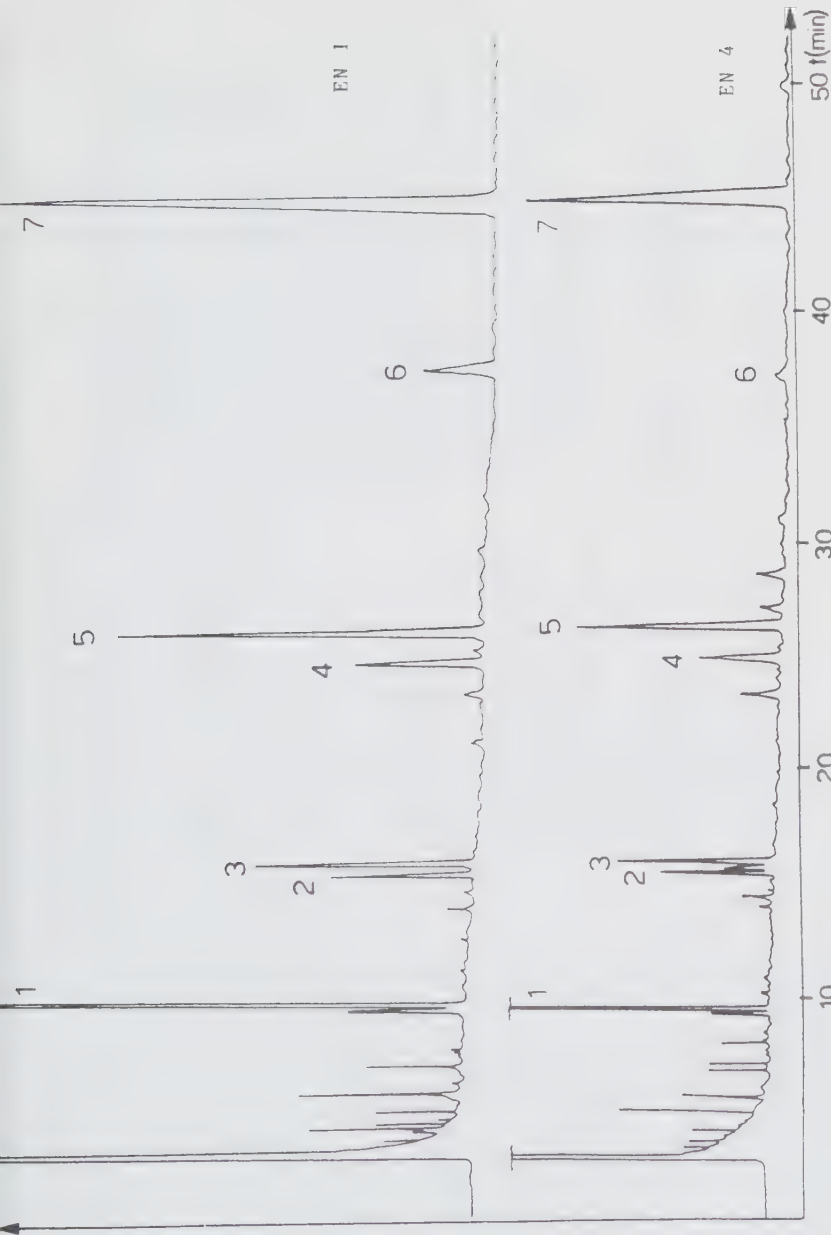


Abb. 2. Gaschromatogramme der partiell methylierten Alditolacetatgemische von Polysaccharid EN 1 und EN 4 /OV-225 Kapillarsäule, $T=210^{\circ}\text{C}$

Tabelle 18: Methylierungsanalyse der Polysaccharide EN 1 und EN 4

Peak	molare Zusammensetzung# EN 1	molare Zusammensetzung# EN 4	Alditolacetate	charakteristische Bruchstücke (m/e)
1	1,55	1,66	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol + 1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-fucitol	89, 101, 115, 117, 131, 161, 175 C-1-H 89, 101, 102, 117, 118, 131, 161, 162, 175 C-2-D
2	0,25	0,34	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galaktitol	87, 101, 117, 129, 145, 161, 205 C-1-H 87, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205 C-1-D
3	0,4	0,5	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-xylitol	87, 101, 117, 129, 161, 189 C-1-H 87, 88, 101, 117, 130, 161, 190 C-1-D
4	0,35	0,41	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-galaktitol	87, 99, 101, 129, 145, 161, 189 C-1-H 87, 88, 100, 101, 129, 131, 145, 161, 190, 205 C-1-D
5	1,0	1,0	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol	87, 99, 101, 113, 117, 129, 131, 161, 173, 233 C-1-H 87, 99, 102, 113, 118, 129, 131, 162, 173, 233 C-1-D
6	-	-	Xylitolpentaacetat	85, 103, 115, 127, 145, 158, 175, 187, 200, 217 C-1-H 85, 86, 103, 115, 116, 128, 145, 146, 159, 187, 188, 201, 217, 218 C-1-D
7	1,97	2,0	1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-glucitol	85, 87, 99, 101, 117, 127, 159, 161, 187, 201, 161 C-1-H 85, 87, 99, 101, 118, 127, 159, 161, 188, 201, 161 C-1-D

Die Werte für die molare Zusammensetzung wurden nach SWEET (57) korrigiert

Peak 1 konnte aufgrund seines MS-Spektrums nicht zugeordnet werden, da sich hier terminale Xylose und terminale Fucose überlappten und zu einem MS-Mischspektrum führten. Peak 3 stammt von (1→2)-verknüpfter Xylose. Da (1→2)- und (3→4)-verknüpfte Xylose gleiche Massenspektren lieferten, erwies sich die Reduktion mit NaBD₄ als vorteilhaft. Durch den Deuteriumeinbau war das C-1-Atom markiert und die Verbindung konnte als (1→2)-verknüpft erkannt werden.

Peak 2 und Peak 4 wurden durch Vergleich der MS-Spektren mit Literaturdaten und unter Zuhilfenahme der Retentionszeiten als partiell methylierte Alditolacetate von terminaler und (1→2)-gebundener Galaktose identifiziert.

Der in beiden GC-Spektren dominierende Peak 7 erwies sich nach dem Massenspektrum als 1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-hexitol. Er konnte der 1,4,6-verzweigten Glucose zugeordnet werden. Der Peak 5, der als 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol identifiziert werden konnte, stammt von (1→4)-verknüpfter Glucose. (1→4)-verknüpfte Glucose aus permethylierter Stärke lieferte ein Alditolacetat mit der gleichen Retentionszeit und demselben MS-Zerfallmuster. Peak 6 stellte ein Pentitolacetat dar und ist wahrscheinlich auf untermethylierte Xylose zurückzuführen.

Zur sicheren Zuordnung von Peak 1 wurden die partiell methylierten Alditolacetate über eine GC-Kapillarsäule vom Typ OV 1701 aufgetrennt. Wie aus Abb. 23 ersichtlich, weisen auf dieser Säule terminale Xylose (Peak A) und terminale Fucose (Peak B) unterschiedliche Retentionszeiten auf, so daß eine Identifizierung aufgrund ihrer MS-Spektren möglich war. (1→2)-verknüpfte Xylose (Peak C) und terminale Galaktose (Peak D) wurden auf diesem Säulenmaterial in umgekehrter Reihenfolge eluiert. Die Zuordnung der Peaks E-G zu den einzelnen partiell methylierten Alditolacetaten ist in Tabelle 19 angegeben.

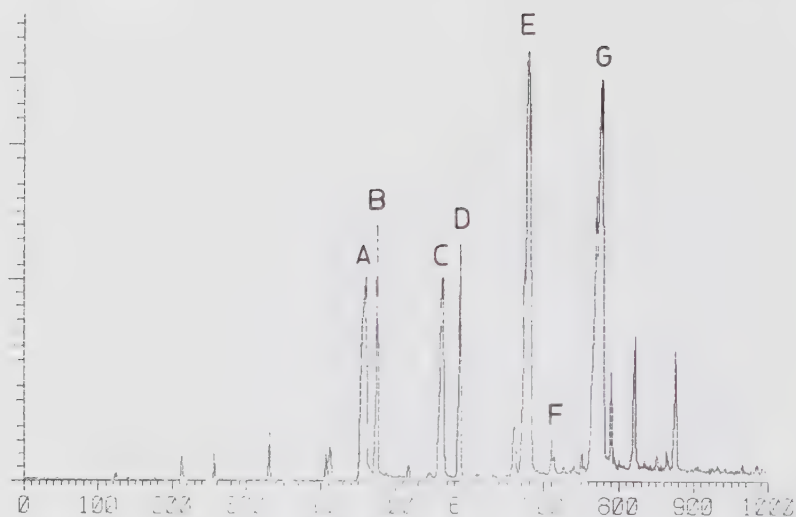


Abb. 23 Ionenchromatogramm der partiell methylierten
Alditolacetate von Polysaccharid EN 4 an OV 1701
Kapillarsäule OV 1701, Temperaturprogramm: 100°C bis ca.
260°C mit 3°C/min)

Tabelle 19: Methylierungsanalyse des Polysaccharides EN 4

Peak	Alditolacetate	charakteristische Bruch- stücke (m/e)
A	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol	87,101,117,129,161,
B	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-fucitol	89,101,115,117,131,161,175
C	1,2,5-Tri-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-xylitol	87,99,101,117,129,161,189,207
D	1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl- galaktitol	87,101,117,129,145,161,205
	1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl- glucitol	87,99,101,113,117,129,131,142, 159
E	1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl- galaktitol	161,173,203,207,233
F	Xylitolpentaacetat	85,103,115,145,158,187,200,217, 233,289
G	1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl- glucitol	85,101,117,127,159,161,187,201, 261

Faßt man die bisherigen Ergebnisse zusammen, so kann man unter Berücksichtigung der in der Literatur bekannten Polysaccharidtypen annehmen, daß die Polysaccharide EN 1 und EN 4 Xyloglucane mit stark verzweigten (1→4)-β-Glucangrundgerüsten und relativ heterogen aufgebauten Seitenketten darstellen.

Da für beide Polysaccharide EN 1 und EN 4 identische und prozentual gleiche Zuckerbestandteile nachgewiesen und bei der Methylierungsanalyse gleiche Bindungsverhältnisse gefunden wurden (S. Tab. 18), beschränkten wir uns bei den weiteren Untersuchungen auf das Polysaccharid EN 4, das uns als Reinprodukt im größeren Ausmaße zur Verfügung stand.

VI.4. Partialhydrolyse des Polysaccharides EN 4

Nach den Ergebnissen der Methylierungsanalysen liegt in beiden Polysacchariden EN 1 und EN 4 terminale Fucose vor. Solche endständigen Desoxyzucker sind äußerst säurelabil und können unter milden Hydrolysebedingungen mehr oder weniger selektiv abgetrennt werden.

Zur Bestimmung des Verknüpfungspunktes der terminalen Fucose wurde methyliertes Polysaccharid EN 4 mit 90% Ameisensäure bei 70°C, 40 Minuten lang, hydrolysiert. Diese Hydrolysebedingungen werden in der Literatur (79) allgemein als geeignet beschrieben, um terminale Desoxyzucker aus Polysacchariden relativ selektiv abzuspalten. Die Markierung der durch Hydrolyse entstandenen freien Hydroxylgruppen erfolgte durch eine zweite Methylierung mit deuteriertem Methyljodid. Anschließend wurde das Polysaccharid vollständig hydrolysiert, die Zucker in die partiell methylierten Alditolacetate überführt und über GC-MS analysiert.

Im Vergleich zum nativen Polysaccharid konnte im Partialhydrolysat terminale Fucose nicht mehr nachgewiesen werden. Der Gehalt an (1→2)-verknüpfter Galaktose und 1,4,6-verzweigter Glucose hatte stark abgenommen, während sich der Gehalt an (1→4)-verknüpfter Glucose erheblich erhöht hatte. Auch terminale Glucose, die im Nativpolysaccharid nicht nachzuweisen war, konnte im Partialhydrolysat festgestellt werden.

Neben der Abspaltung von Desoxyzuckern war es bei der Partialhydrolyse demnach zum partiellen Abbau des Glucangrundgerüsts gekommen. Bei der anschließenden Methylierung wurde daher nicht nur der Verknüpfungspunkt der terminalen Fucose selektiv gekennzeichnet, sondern es kam auch in den übrigen partiell methylierten Alditolacetaten zu einem mehr oder weniger großen Einbau von deuterierten Methylgruppen.

Trotzdem kann man mit einiger Sicherheit annehmen, daß die Fucose am C-2 der Galaktose gebunden ist. Dafür sprechen zwei Gründe:

- 1.) Der Gehalt an (1→2)-verknüpfter Galaktose hatte im Partialhydrolysat stark abgenommen und Fucose war als einziger Zucker überhaupt nicht mehr nachweisbar.
- 2.) Ungefähr 60% der terminalen Galaktose zeigte ein Massenspektrum mit charakteristischen Bruchstücken von m/e 121 und 164, die auf den Einbau einer deuterierten Methylgruppe in C-2 Stellung hinweisen (Abb. 24).

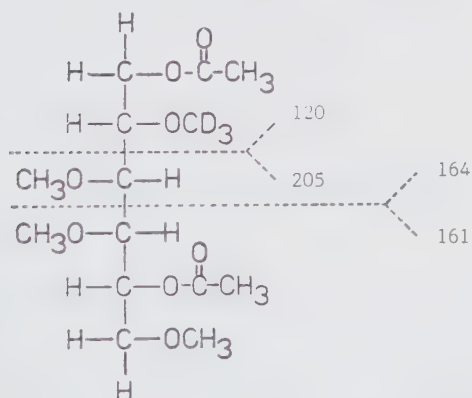


Abb. 24

Charakteristische Fragmentationen von 1,5-Di-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-2-O-deuteromethyl-galaktitol

VI.5. Enzymatischer Abbau des Polysaccharides EN 4

Um weitere Informationen über die Natur der Seitenketten und ihre Verknüpfungsweise zum Glucangrundgerüst zu erhalten, wurde das Polysaccharid EN 4 mit Cellulase "Onozuka R- 10^R" aus *Trichoderma viride* behandelt. Diese Cellulase stellt ein Gemisch aus Exo-, Endoglucanase und β -Glucosidase dar, besitzt aber auch Fremdaktivitäten, wie α -Amylase-, Pektinase- und Xylanaseaktivität. In dieser Form spaltet die Cellulase aus Xyloglucanen auch kleine Bruchstücke, wie Mono- und Disaccharide ab, die nach entsprechender Derivatisierung über GC-MS untersucht werden können (79).

Nach erschöpfendem enzymatischem Abbau (72 h bei 37°C) des Polysaccharides wurde das Hydrolysegemisch dünn-schicht= chromatographisch untersucht. Als Monosaccharide konnten (s.Abb.25) Xylose, Glucose und Galaktose nachgewiesen werden. Im R_f-Bereich der Oligosaccharide waren zwar einige Zonen detektierbar, konnten aber nicht identifiziert werden.

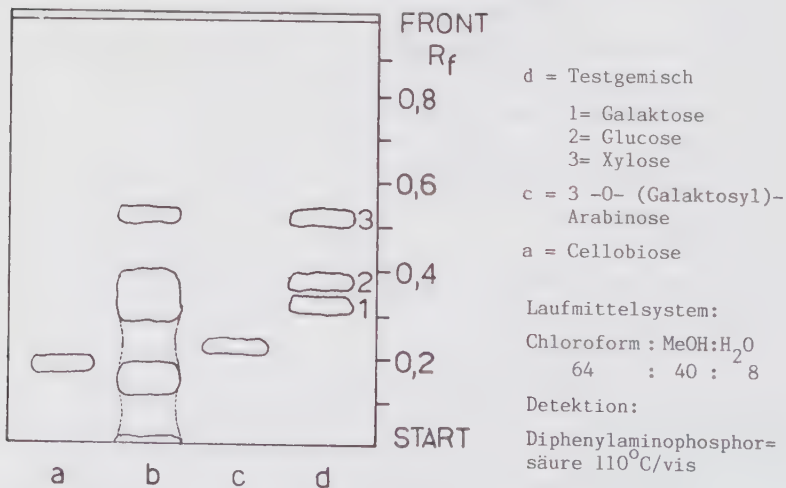


Abb. 25

Dünnschichtchromatogramm des enzymatischen Hydrolysege= misches von Polysaccharid EN 4 (b)

Das Hydrolysegemisch wurde mit NaBD_4 reduziert, anschließend methyliert und die methylierten Disaccharid-Alditole über GC-MS untersucht.

KOCHETKOV und CHIZHOV (81,82) entwickelten ein Nomenklatur-Schema für die Massenfragmente, die bei MS-Untersuchungen von unverzweigten permethylierten Oligosaccharid-Alditolen entstehen können. Da bei den folgenden Ausführungen dieses Nomenklatorsystem des öfteren verwendet wird, soll es kurz erläutert werden:

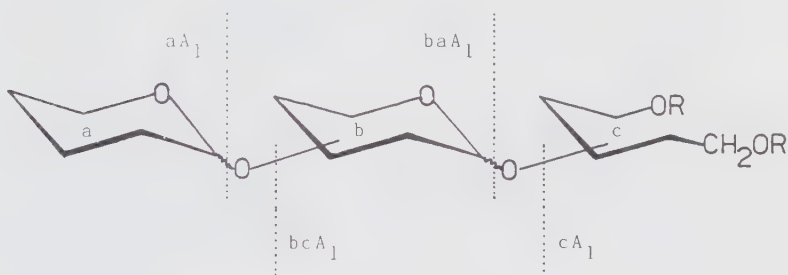


Abb.26 Nomenklaturbeispiel für die Massenfragmente von Oligosaccharidderivaten

Einzelne Zuckerbestandteile von Oligosacchariden werden mit kleinen Buchstaben bezeichnet. Die nicht reduzierende Endgruppe erhält den Buchstaben a, während der reduzierte Zucker in alphabetischer Reihenfolge mit dem jeweils letzten Buchstaben bezeichnet wird. Der reduzierte Zucker in einem Trisaccharid (Abb.26) erhält so den Buchstaben c. Großgeschriebene Buchstaben bezeichnen mögliche MS-Fragmentierungswege (s. Abb.27). Durch zusätzliche Zahlen werden weitere Spaltprodukte innerhalb einer bestimmten Fragmentierungsserie gekennzeichnet. Die am leichtesten zuzuordnenden Fragmente in der Massenspektroskopie von methylierten Oligosaccharid-Alditolen sind jene der nicht reduzierten Endgruppen, d.h. die A₁-Ionen bei m/e 219 für permethylierte Hexosen, m/e 189 für permethylierte Desoxyzucker und m/e 175 für permethylierte Pentosen. Ebenso zeigen die reduzierten Zucker charakteristische Fragmente von m/e 236 für Hexosen und m/e 192 für Pentosen.

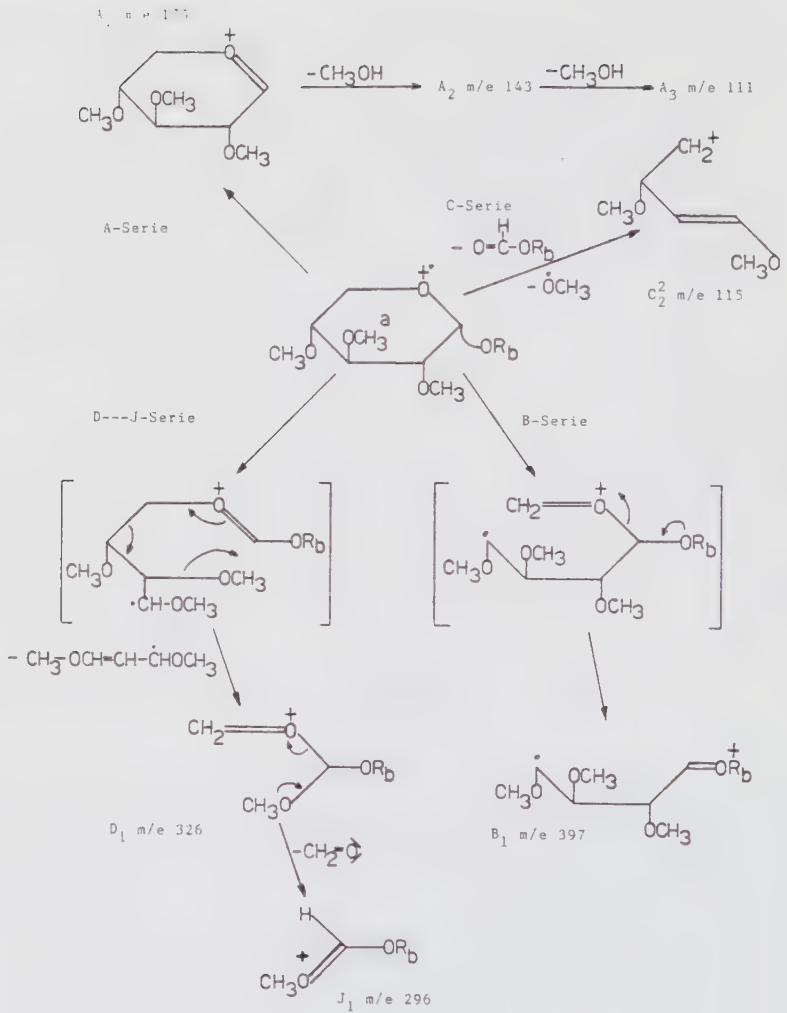


Abb. 27

MS-Fragmentierung des Pentosylrestes (a) eines permethylierten Pentosyl-hexitols.

Nomenklatur nach KOCHETKOV und KOVACIK (81)

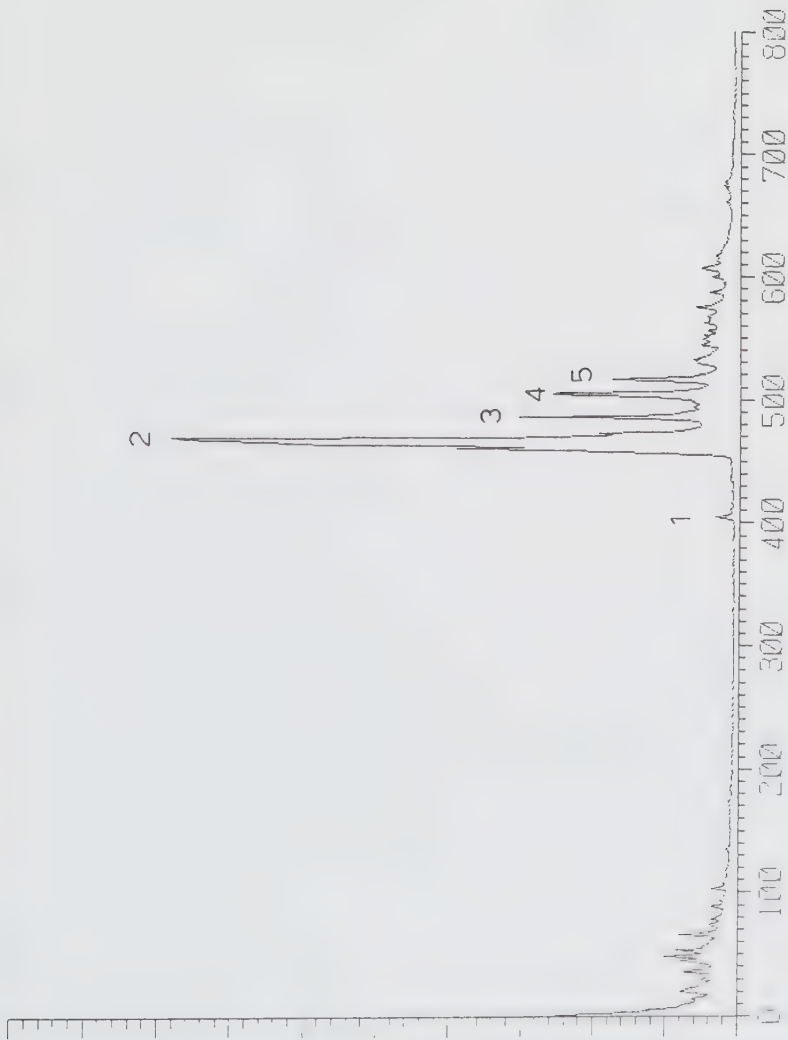


Abb. 28

Ionenchromatogramm der permethylierten Oligosaccharid-Alditole, die durch enzymatische Hydrolyse aus dem Polysaccharid EN 4 gewonnen wurden
(Quarzkapillare OV 1701, Temperaturprogramm: 170°C bis ca. 270°C mit 3°C/min)

Abb. 28 gibt das Ionenchromatogramm der GC-MS-Analyse des reduzierten, permethylierten Polysaccharidhydrolysates wieder. Fünf Peaks wurden detektiert. Ihre Charakterisierung erfolgte aufgrund folgender Kriterien:

- 1.) Relative Retentionszeit zu methyliertem Cellobiitol und Vergleich mit Literaturwerten
- 2.) Vorhandene Informationen aus den Methylierungsanalysen
- 3.) Charakteristische Massenfragmente (m/e).

Peak 1 ($R=0,87$) wurde im permethylierten Disaccharid-Alditol-Bereich eluiert und zeigt charakteristische (m/e)-Ionen der aA-(m/e 175, 143 und 111) und der bA-Serie (m/e 236, 204 und 172). Diese Fragmente lassen auf ein Pentosyl-hexitolderivat schließen, wobei die Hexose in reduzierter Form (m/e 236), die Pentose (m/e 175) in nicht reduzierter Form, also am C-1 substituiert vorliegen muß. Charakteristische Ionen von m/e 134, 178 und 222 zeigen, daß die reduzierte Hexose in Position C-6 substituiert sein muß. Andere Massenbruchstücke von m/e 296 und m/e 261 bestätigen diese Interpretation. Da durch Cellulaseeinwirkung hauptsächlich (1 $\rightarrow$ 4)- β -Bindungen zerstört werden und über Zucker- und Methylierungsanalyse Xylose als einzige Pentose nachgewiesen wurde, könnte das methylierte Disaccharid-Alditol von Peak 1 von einer (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Xylosylglucose-Einheit stammen.

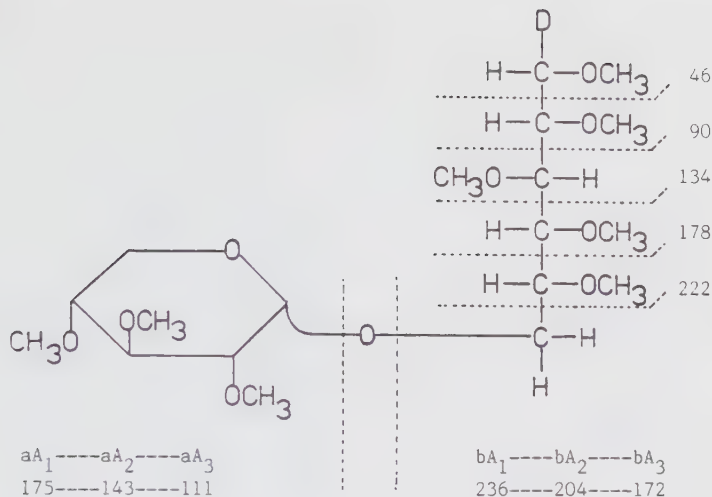


Abb. 29

Charakteristische Massenfragmente (m/e) des permethylierten Pentosyl-hexitols (82)

Peak 2, der größte Peak des Ionenchromatogrammes wurde mit derselben Retentionszeit wie methyliertes Cellobiitol eluiert. Charakteristische Ionen der aA-Serie von m/e 236 und m/e 219 weisen auf ein Hexosyl-hexitolderivat hin. Bestätigt wird dies durch die Massenfragmente m/e 187 (219-32), m/e 204 (236-32) und m/e 172 (236-64). Die Ionen m/e 296 (236+60) der abJ₁-Serie und m/e 381 (471-90) lassen ebenfalls auf ein solches Derivat schließen.

Da Bruchstücke von m/e 222 und m/e 178 vollständig fehlen - diese würden auf eine (1→6)-Bindung hindeuten - und ein relativ intensives Ion m/e 134 zu beobachten ist, liegt wahrscheinlich eine (1→4)-Verknüpfung vor.

Die einzige (1→4)-verknüpfte Hexose im gesamten Polysaccharid stellt, wie die Methylierungsanalyse ergab, Glucose dar. Somit ist dieses Disaccharid-Alditol eindeutig als Cellobiitol identifiziert.

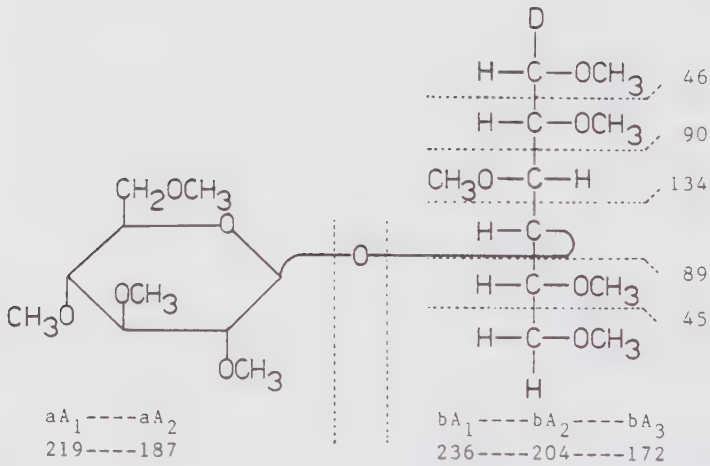


Abb. 30

Charakteristische Massenfragmente (m/e) des permethylierten Hexosyl-hexitols (83)

Die übrigen Peaks konnten nicht zugeordnet werden.
Möglicherweise handelt es sich um Artefakte der Methylierungsanalyse.

Tabelle 20: Charakteristische Massenfragmente der Perme-
thylierten Oligosaccharid-Alditole aus Cellu-
lase-behandeltem Polysaccharid EN 4

m/e Werte	Relative Intensität	
	Peak 1	Peak 2
45	90	78
46	38	24
71	66	44
75	62	44
88	98	100
89	33	40
90	42	12
101	100	90
102	32	
111	30	42
115	34	24
127	10	10
134	12	10
143	60	
146	32	
155		6,5
172	8	18
175	42	
187	9	50
204	2	1,0
219	6	20
235		
236	22	58
250	6	
261	2	
296	10	18
381		0,6

VI.6. Acetolyse des Polysaccharides EN 4

Die Acetolyse wird wie die Partialhydrolyse (s. Kapitel VI.4.) oder spezielle enzymatische Methoden zur partiellen Depolymerisation von Polysacchariden eingesetzt, mit dem Ziel kleinere Zuckereinheiten zu erhalten. Während bei der Partialhydrolyse vor allem furanosidische Zucker und terminale Desoxyzucker abgespalten werden, werden bei der Acetolyse, die unter nichtwässrigen Bedingungen erfolgt, speziell (1→6)-Bindungen angegriffen. Bei Polysacchariden, die einen solchen Bindungstyp aufweisen, wie Mannane aus Pilzen und Hefe (84), aber auch Xyloglucane (83), wurde die Acetolyse daher häufig eingesetzt, um Informationen über den Seitenkettenaufbau zu erhalten.

Aufgrund der Methlierungsanalysen konnten in unseren Polysacchariden relativ große Anteile an (1→6)-Verknüpfungen gefunden werden. Die Voraussetzung für die Acetolyse war somit gegeben.

Acetyliertes Polysaccharid EN 4 wurde mit einer Mischung aus Schwefelsäure, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (0,1:1:1) zwölf Stunden bei Raumtemperatur und acht Stunden bei 100°C acetolysiert (83). Das erhaltene Zuckergemisch wurde dann mit Natriumethoxid in Ethanol (1M) desacetyliert, mit NaBD₄ reduziert und anschließend methyliert. Die Identifizierung der methylierten Oligosaccharid-Alditole erfolgte über GC-MS unter Anwendung der in Kapitel VI.5 beschriebenen Kriterien.

Das Ionenchromatogramm zeigte im Disaccharid-Bereich 5 Peaks, allerdings im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse in verhältnismäßig geringen Intensitäten. Auffallend war, daß die Peaks 1 und 3 bzw. 4 und 5 jeweils ein identisches Massenspektrum aufwiesen.

Bei Peak 1 und 3 handelte es sich vermutlich um Hexosyl-pentitolderivate. Charakteristische Massenfragmente von m/e 219 für den nicht reduzierten Hexoseteil und m/e 192 für die reduzierte Pentose bestätigten dies. Davon ableiten lassen sich die Ionen m/e 160 und 128 bzw. m/e 187 und 155, die durch Methanolabsplaltung entsprechend der aA-Serie

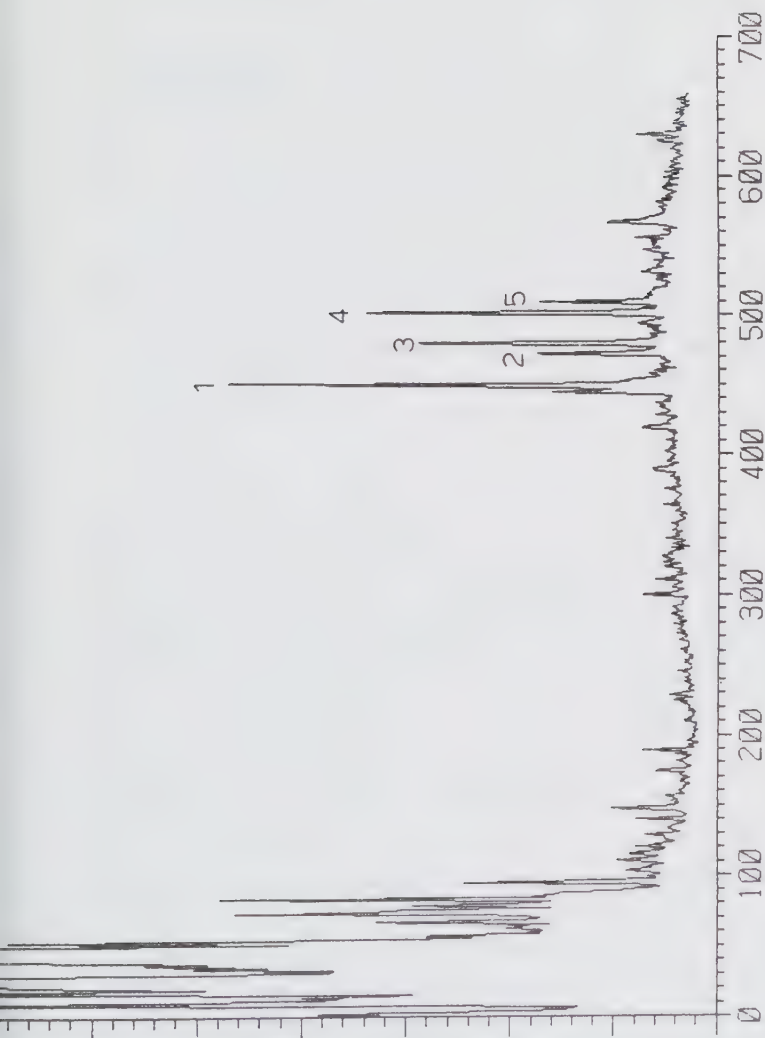


Abb. 31

Ionenchromatogramm der permethylierten Oligosaccharid-Alditole, die durch Acetolyse des Polysaccharides EN 4 hergestellt wurden.
(Quarzkapillare OV 1701, Temperaturprogramm: 170°C bis ca. 270°C mit 3°C/min)

und der bA-Serie entstehen. Ebenfalls auf ein Hexosyl-pentitolderivat wies die Masse m/e 252 (192+60) (abJ₁) hin. Das relativ intensive Ion m/e 133 zeigte eine (1→2)-Verknüpfung. Das Massenfragment m/e 90, das für eine (1→3)- oder eine (1→4)-Verknüpfung sprechen würde, fehlte. Nicht erklärt werden konnte die große Intensität des Masseniens m/e 192.

Da aufgrund der Methylierungsanalyse des Nativpoly=saccharides bekannt war, daß Xylose die einzige (1→2)-verknüpfte Pentose und Galaktose die einzige terminale Hexose darstellen, müßte es sich bei Peak 1 und Peak 3 um die gleichen permethylierten Galaktose (1→2)-Xylose-Alditolderivate aber mit unterschiedlicher Konfiguration handeln.

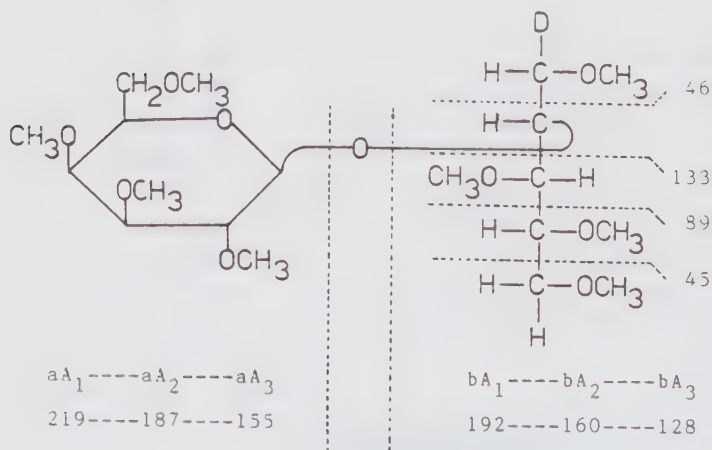


Abb. 32

Charakteristische Massenfragmente (m/e) des permethylierten Hexosyl-pentitols

Da nach dem ^{13}C -NMR-Spektrum des Polysaccharides alle Hexosen die β -Konfiguration aufwiesen (vergleiche Kapitel VI.8.1.), müßte eines der beiden Disaccharid=derivate ein Kunstprodukt sein.

ASPINALL (85) beschreibt, daß es bei der Acetolyse von Polysacchariden zur säurekatalysierten Anomerisierung an der glykosidischen Bindung kommen kann. Offenbar neigen hierzu Polysaccharide mit vorwiegend in β -Konfiguration verknüpften Zuckereinheiten, da sich diese leicht in die thermodynamisch stabilere α -Form umlagern. Signifikante Anomerisierungen wurden auch bei der Acetolyse von (1 $\rightarrow$ 6)-verknüpften Arabinogalaktanen beobachtet. Auch bei anderen Polysacchariden, wie Mannanen (86), Glucomannanen (87,88) und Galaktanen (85) konnten während der Acetolyse Anomerisierungen festgestellt werden. In jedem Fall kam es zur Bildung von Spaltprodukten, die mit dem ursprünglichen Polysaccharid in konfigurativer Hinsicht nicht mehr übereinstimmten. Da unser Polysaccharid vorwiegend aus β -verknüpften Zuckern aufgebaut war, zudem noch ein großer Prozentsatz an (1 $\rightarrow$ 6)-Bindungen vorlag, sollte es sich bei den Peaks 1 und 3 bzw. Peak 4 und Peak 5 um Anomerengemische handeln, die durch Epimerisierung bei der Acetolyse entstanden waren.

Peak 4 konnte durch das Massenspektrum und die Retentionszeit, als permethyliertes Cellobiitol identifiziert werden.

Peak 5 stellt wahrscheinlich das anomer verknüpfte methylierte Disaccharidderivat Maltobiitol dar.

Peak 2 zeigte ein Massenspektrum mit den intensiven Ionen m/e 189 und 236. Sie entsprechen einem nicht reduzierenden Desoxyzucker und einer reduzierten Hexose.

Charakteristische Massenfragmente von m/e 157 (189-32), 172 (236-64) und 296 (236+60) stimmen damit überein. Aufgrund der Ionen m/e 177, 145 (177-32) und 133 könnte eine (1 $\rightarrow$ 2)-Verknüpfung vorliegen. Dafür spricht auch das vollständige Fehlen des Massenfragmentes m/e 90. Eine (1 $\rightarrow$ 6)-Verknüpfung kann man wegen des Bruchstückes m/e 352 (441-89) nahezu ausschließen. Bei der Methylierungsanalyse und Partialhydrolyse des Nativpolysaccharides stellte sich heraus, daß der einzige vorliegende Desoxyzucker Fucose wahrscheinlich in Position C-2 der Galaktose gebunden ist. Daher könnte Peak 2 das entsprechende Permethylderivat von Fucose-(1 $\rightarrow$ 2)-Galaktose darstellen.

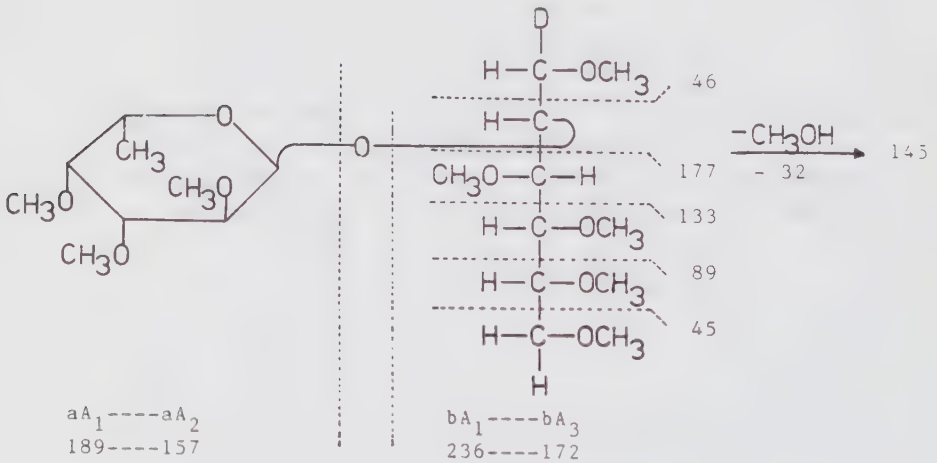


Abb. 33

Charakteristische Massenfragmente (m/e) des permethylierten Desoxyhexosyl-hexitols

Tabelle 21: Charakteristische Massenfragmente der permethylierten Oligosaccharid-Alditole, die durch Acetolyse des Polysaccharides EN 4 hergestellt wurden.

m/e Werte	Relative Intensität		
	Peak 1+3	Peak 2	Peak 3+4
45	94	40	72
46	20	13	18
71	48	31	40
72	62	22	
75	32	26	47
88	100	100	100
89	24	24	40
90			12
101	70	62	87
111	26		38
115			28
127	12		12
129		18	
133	14		
134			10
145		18	
155			11
157		12	
160	18		
172		12	10
175			
177		6	
187	14		50
189		26	
192	90		
204			
207		4	
219	6		12
236		20	48
252	18		
294	0,5		
296		16	18
306	1,0		
352		3	
381			6

VI.7. ENZYMATISCHER ABBAU DES POLYSACCHARIDES EN 4
MIT PARTIELL GEREINIGTER ENDO-(1-4)- β -GLUCANASE.

VI.7.1. Enzymreinigung

Zur näheren Charakterisierung von Xyloglucanen werden in der Literatur wiederholt Abbaureaktionen mit Endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucanase (19) beschrieben. Dieses Enzym greift selektiv die (1 $\rightarrow$ 4)- β -Bindungen des Xyloglucangrundgerüsts an, so daß größere Oligosaccharidbruchstücke entstehen, die isoliert und strukturell untersucht werden können.

Da käufliche Cellulasen immer Enzymgemische (89) darstellen, die aus Cellobiohydrolasen, β -Glucosidasen und Endo- und Exoglucanasen bestehen, bedarf es zur gezielten Depolymerisation eines Polysaccharides der Vorreinigung dieses Enzymgemisches.

Als Ausgangsmaterial verwendeten wir wiederum Cellulase "Onozuka R-10^R" aus *Trichoderma viride*. Analog einem von MANDELS und REESE (90) ausgearbeiteten Reinigungsverfahren versuchten wir die Cellulase über Anionenaustauschchromatographie in einzelne Bestandteile aufzutrennen. Dazu beschickten wir DEAE-Sephrose CL 6 B,

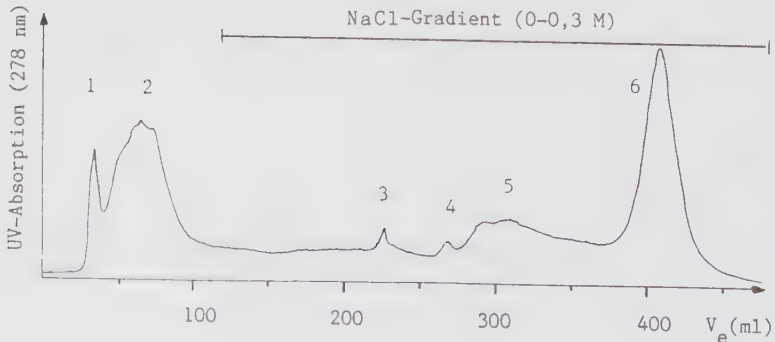


Abb. 34

Fraktionierung von Cellulase "Onozuka R-10^R"
an DEAE-Sephrose CL 6 B

equilibriert mit 20 mmolarem Phosphatpuffer pH 7,0, mit 200 mg Cellulase. Die Elution erfolgte zuerst mit Phosphatpuffer, dann mit einem NaCl-Gradienten von 0 bis 0,3 M. Die UV-Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 278 nm durchgeführt.

Wie aus Abb. 34 ersichtlich erhielten wir insgesamt 6 Peaks. Peak 1 und 2 wurden als "Neutralsubstanzen" eluiert, während Peak 3 und 6 mit dem NaCl-Gradienten desorbiert wurden. Nach Dialyse gegen 50 mM Phosphatpuffer wurden die einzelnen Fraktionen auf ihre Enzymaktivität überprüft. Als Testsubstanz verwendeten wir Polysaccharid EN 4. Dieses wurde in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,2 gelöst und mit den verschiedenen Enzymfraktionen zwei Tage lang bei 37°C inkubiert. Die Mischungen wurden anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht. Die Fraktionen 1 und 2 spalteten, ähnlich der Cellulase, vom Polysaccharid Glucose und Cellobiose ab, während bei den Fraktionen 3 bis 6 keine merklichen Mengen an Mono-, Di- und Trisacchariden nachweisbar waren. Die Fraktionen 1 und 2 könnten demnach Cellobiohydrolasen bzw. β -Glucosidasen darstellen. Da Fraktion 6 im Chromatogramm den intensivsten Peak ergab, wurde diese auf Endo (1 $\rightarrow$ 4) β -D-Glucanaseaktivität gegenüber Carboxymethylcellulose (90,91) untersucht. Der Abbau wurde über HP-GPC verfolgt.

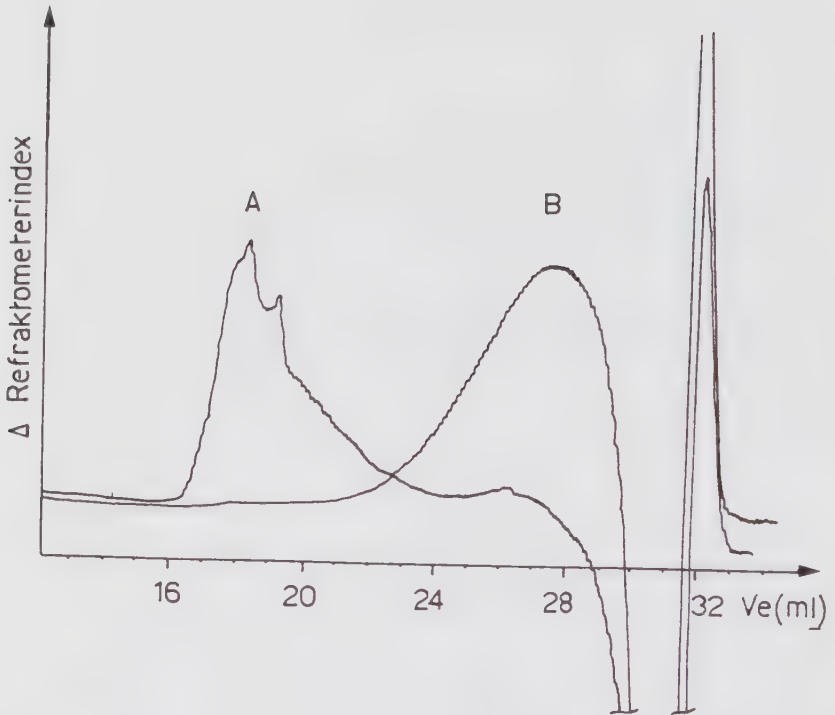


Abb.35

HP-Gelpermeationschromatogramm von Carboxymethylcellulose (A) und Carboxymethylcellulose, die mit Enzymfraktion 6 behandelt wurde (B)

Säule: TSK PW 4000/ Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0

Abbildung 35 zeigt, daß das Molekulargewicht der Carboxymethylcellulose nach 24-stündiger Inkubation mit dem Enzym beträchtlich abgenommen hatte, so daß auf eine Endo (1→4)-β-Glucanase-Aktivität dieser Fraktion geschlossen werden konnte. Für die weiteren Untersuchungen kam daher diese Fraktion 6 zur Anwendung.

VI.7.2. Enzymatischer Abbau des Polysaccharides EN 4

Das Polysaccharid EN 4 (70 mg) wurde in 50 mmolarem Natriumacetat-Puffer pH 5,2 gelöst und mit partiell gereinigter Endoglucanase (Fraktion 6) 48 Stunden bei 40°C inkubiert. Die Abbaurrate wurde über HP-GPC nach 18, 24 und 48 Stunden bestimmt. Wie aus Abb.36 ersichtlich, kam es in den ersten 24 Stunden zu einer beträchtlichen Molekulargewichtsverkleinerung des Polysaccharides, während danach praktisch keine Veränderung mehr festzustellen war.

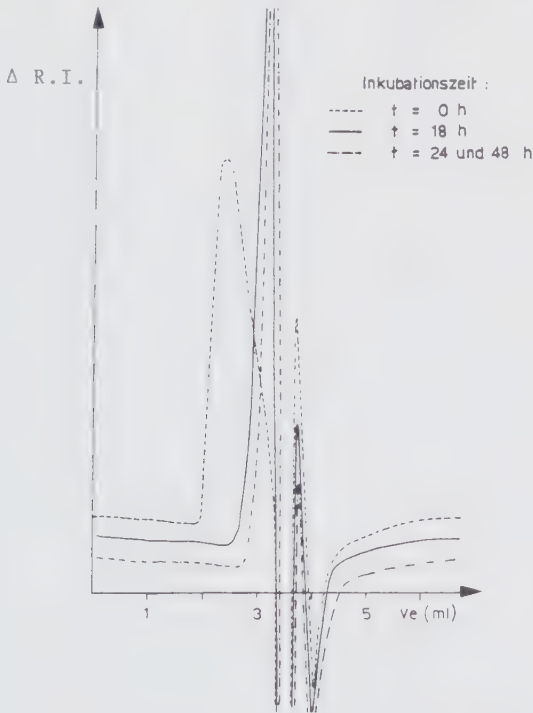


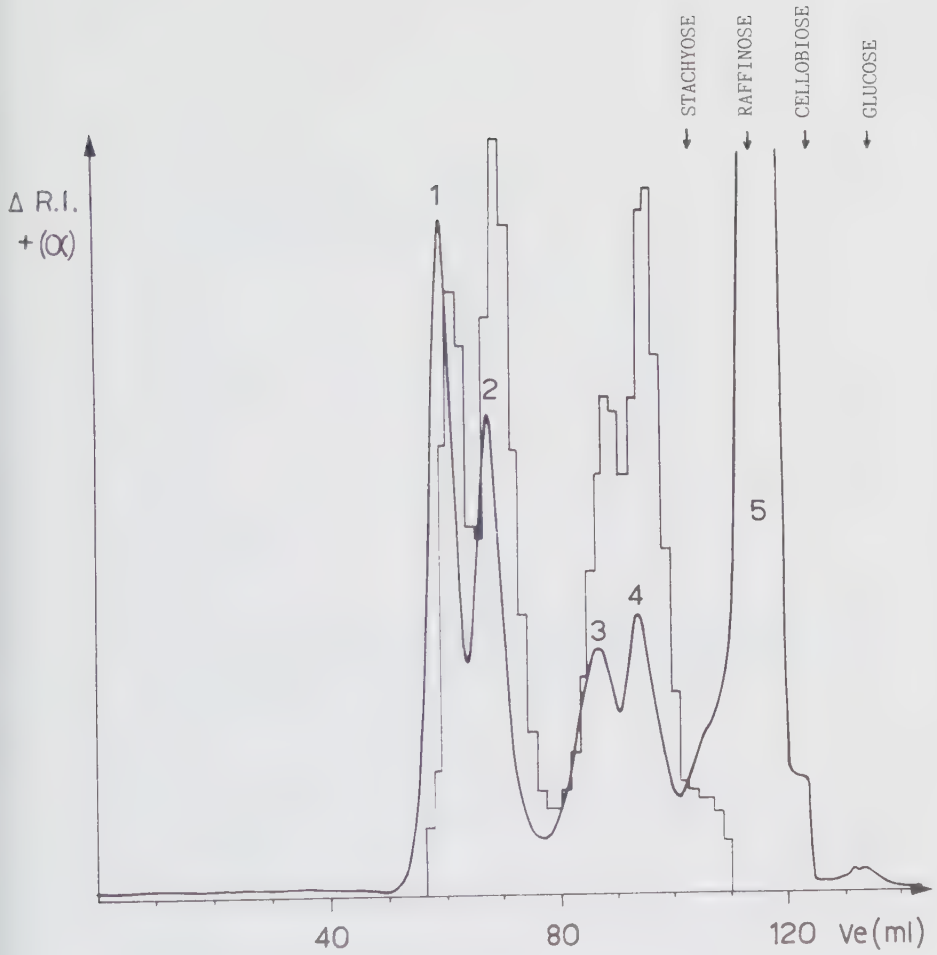
Abb.36 HP-Gelpermeationschromatogramme der enzymatischen Abbauprodukte des Polysaccharides EN 4 nach Inkubationszeiten von 0 , 18 , 24 und 48 Stunden.

Säule: μ -Porasil 60/Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0/
Refraktometerdetektion

Nach Zerstörung restlicher Enzymaktivität durch kurzes Erhitzen wurde das Gemisch dünn-schichtchromatographisch untersucht. Es waren nur Spuren von Mono-, Di- und Tri-sacchariden nachzuweisen.

Anschließend erfolgte eine Fraktionierung des Reaktionsgemisches über Bio-Gel P-2 bei 50°C. Das Ergebnis dieser Gelchromatographie, die mit destilliertem Wasser als Eluens durchgeführt wurde, wird in Abb. 37 gezeigt. Zum Vergleich sind die Elutionsvolumina von Glucose, Cellobiose, Raffinose, Stachyose und unbehandeltem Xyloglucan eingezeichnet.

Da Peak 5 weder optische Aktivität, noch eine positive Reaktion im Anthrontest zeigte, beschränkten wir uns auf die Untersuchung von Peak 2, 3 und 4, die zwischen der Stachyose und dem Xyloglucanteil im Ausschlußvolumen (Peak 1) eluiert wurden. Dazu wurden entsprechende Fraktionen gesammelt, gefriergetrocknet und anschließend dünn-schichtchromatographiert. Peak 4 und 2 lieferten im Laufmittelsystem n-BuOH:Aceton:H₂O:Essigsäure (21:21:24:6) jeweils nur eine Zone, während sich Peak 3 in 2 Flecken auftrennte. Die mengenmäßig größeren Fraktionen, entsprechend Peak 2 und 3, wurden einer erneuten Gelfiltration an Bio-Gel P-2 unterworfen. Dabei erwies sich Peak 2 als gelchromatographisch homogen. Peak 3 wurde erwartungsgemäß in mehrere Fraktionen aufgetrennt. (Abb. 37, 38)



— Refraktometer - Detektion
⏏ Polarimeter - Detektion

Abb. 37

Gelchromatographie des enzymatisch behandelten Poly=saccharides EN 4 an Bio-Gel P-2/Eluens: H_2O

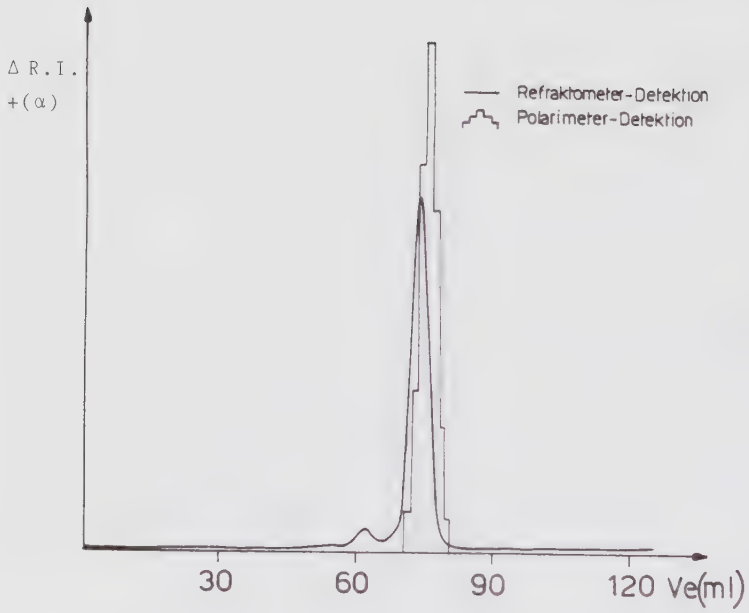


Abb. 38

Gelchromatographie der Bio-Gel-Fraktion 2 an Bio-Gel P-2

Eluens: H_2O

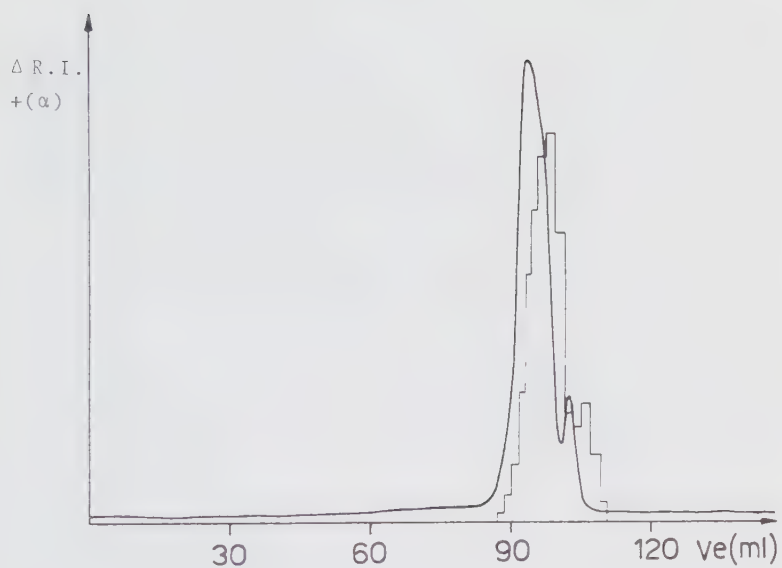


Abb. 39

Gelchromatographie der Bio-Gel-Fraktion 3 an Bio-Gel P-2

Eluens: H_2O

VI.7.3. Zuckerzusammensetzung der Xyloglucan-Oligo=
saccharide

Die Hydrolyse wurde, wie üblich, mit 2 N Trifluoressig-
säure (121°C/1,5 h) durchgeführt. Das Zuckergemisch des
Hydrolisates wurde reduziert und anschließend acetyliert.
Die einzelnen Alditolacetate wurden gaschromatographisch
auf ihre molaren Verhältnisse untersucht. Daraus ergaben
sich die in Tabelle 22 zusammengestellten Ergebnisse.
Fraktion 4 enthält nur zwei Zuckerkomponenten, nämlich
Xylose und Glucose, während die übrigen Fraktionen je-
weils vier verschiedene Zucker lieferten.

Tabelle 22: Molare Zuckerzusammensetzung der Xyloglucan-
Oligosaccharide

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule:
SP 2330, 225°C

Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure/1,5 h/121°C

Zucker	Bio-Gel P-2 Peak		
	4	3	2
Fucose	-	1*	0,9
Xylose	2,5	2,7	5,4
Galaktose	Spuren	1,1	2,5
Glucose	4	4	8
Peakverhältnis	1	1	1,5

* nicht genau integriert

VI.7.4. Methylierungsanalyse der Bio-Gel P-2 Oligo =
saccharidfraktionen

Nach der Methylierung nach HAKOMORI wurden die permethy-
lierten Oligosaccharidfraktionen reduziert und acetyliert.

Die Identifizierung der partiell methylierten Alditolacetate erfolgte über die Gaschromatographie. Durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen, die im Rahmen der vorausgehenden Permethylierungsreaktionen für die einzelnen Zuckerbestandteile bestimmt worden waren, konnte die in Tab. 23 wiedergegebene Zuordnung getroffen werden.

Die von terminaler Fucose und terminaler Xylose stammenden Alditolacetate konnten auf der verwendeten Kapillarsäure (OV 225, T=210°C) nicht voneinander getrennt werden.

Tabelle 23: Methylierungsanalyse der Bio-Gel P-2 Oligosaccharidfraktionen

Permethylierte Alditolacetate	molare Zuckerzusammensetzung #			
	Bio-Gel P-2		Peak	
	2	3	4	
2,3,4 Tri-O-methyl-1,5-di-O-acetyl-fucitol	4,7	1,0*	0,7*	-
2,3,4 Tri-O-methyl-1,5-di-O-acetyl-xylitol		3,7	1,3*	2,4
2,3,4,6-Tetra-O-methyl-1,5-di-O-acetyl-galaktitol	1,3	0,5	-	
3,4-Di-O-methyl-1,2,5-tri-O-acetyl-xylitol	1,9	0,5	-	
3,4,6-Tri-O-methyl-1,2,5-tri-O-acetyl-galaktitol	1,5	0,7	-	
2,3,4 Tri-O-methyl-1,5,6-tri-O-acetyl-glucitol	1,0	1,0	-	
2,3,6 Tri-O-methyl-1,4,5-tri-O-acetyl-glucitol	2,3	1,09	1	
2,3 Di-O-methyl-1,4,5,6-tetra-O-acetyl-glucitol	4,8	2	2,0	

nach SWEET (57) korrigiert * kalkulierte Werte

Die Methylierungsanalyse der drei Oligosaccharidfraktionen zeigt, daß ein signifikanter Prozentsatz an (1→6) gebundener Glucose auftritt, die in dieser Form im Nativpolysaccharid nicht nachweisbar ist. Begleitet wird das Auftreten von (1→6)-verknüpfter Glucose von einer entsprechenden prozentuellen Abnahme von 1,4,6-verzweigter Glucose. Dieses Phänomen ist auf die Enzymaktivität zurückzuführen. Endo-(1→4)-β-Glucanasen können das Xyloglucan (19) nur dort angreifen, wo unverzweigte (1→4)-gebundene Glucose vorliegt. Seitenketten in Position C-6 der Glucose dagegen verhindern den Angriff des Enzyms.

Die enzymatische Spaltung des Polysaccharides führt also sowohl zur Bildung von (1→6)-verknüpfter Glucose, als auch zur Freisetzung einer reduzierten Glucose-Endgruppe. Verzichtet man auf eine Reduktion des Oligosaccharides vor der Methylierung, so erscheint die in C-4-Stellung gebundene terminale Glucose in der Gaschromatographie als 1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol. Aufgrund der Zuckeranalyse konnte für Peak 3 und 4 in beiden Fällen ein Glucose/Xylose-Verhältnis von ca. 3:4 ermittelt werden. Zudem besitzen beide Oligosaccharide (1→6)-, (1→4)- und 1,4,6-verknüpfte Glucose im Verhältnis 1:1:2. Es kann also angenommen werden, daß den beiden Oligosacchariden das gleiche Xyloglucangrundgerüst zugrundeliegt.

Da im Oligosaccharid (Peak 4) Xylose ausschließlich in terminaler Verknüpfung vorliegt und andere Zucker außer Glucose und Xylose fehlen, kann folgender Strukturvorschlag gemacht werden.

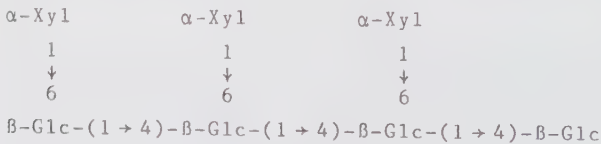


Abb. 40

Die Diskussion der Konfiguration der einzelnen Komponenten erfolgt im NMR-Spektroskopie-Abschnitt. Der zu geringe Gehalt an terminaler Xylose, der in allen drei Oligosacchariden festzustellen ist, kann auf Verluste bei der Methylierungsanalyse dieser flüchtigen Komponente zurückzuführen sein.

Peak 3 besitzt, wie schon oben angeführt, das gleiche Xyloglucangrundgerüst. Zusätzlich zur terminalen Xylose waren in der Methylierungsanalyse noch terminale Galaktose, (1→2)-verknüpfte Galaktose und (1→2)-gebundene Xylose in ca. äquimolarem Verhältnis nachgewiesen worden. In Anlehnung an Literaturangaben über Elutionsvolumina von Nonasacchariden (19) bei der Gelchromatographie an Bio-Gel P-2, kann man ein Dekasaccharid mit folgender Struktur vorschlagen:

α-Fuc

1
↓
2

β-Gal

1
↓
2

β-Gal

1
↓
2

α-Xyl

1
↓
6

α-Xyl

1
↓
6

α-Xyl

1
↓
6

B-Glc-(1→4)-B-Glc-(1→4)-B-Glc-(1→4)-B-Glc

Abb. 41

Wie aus Tab. 23 hervorgeht, ist im Verhältnis zum Glucan-Grundgerüst ein zu geringer Seitenkettenanteil vorhanden. Dies wird auf Verunreinigung mit dem Heptasaccharid (siehe Abb. 40) zurückgeführt.

Peak 2 wird bei der Gelchromatographie über Bio-Gel P-2 in der Nähe des Ausschlußvolumens eluiert. Da aufgrund von Literaturangaben verzweigte Oligosaccharide vom Typ der Xyloglucane mit mehr als 20 Zuckereinheiten im Ausschlußvolumen von Bio-Gel P-2 zu finden sind, muß es sich um ein kleineres Oligosaccharidbruchstück handeln.

In der Methylierungsanalyse lassen sich eine einzige (1→6)-verknüpfte Glucose, zwei (1→4)-gebundene Glucose=reste und fünf 1,4,6-verzweigte Glucoseeinheiten nachweisen. Das Verhältnis von kettenständiger zu endständiger Xylose beträgt ca. 2:4. Daneben sind ungefähr 1,5 Anteile an (1→2)-verknüpfter und terminaler Galaktose vorhanden.

Aufgrund dieser Daten kann man für das Oligosaccharid den nachfolgenden Strukturvorschlag machen.

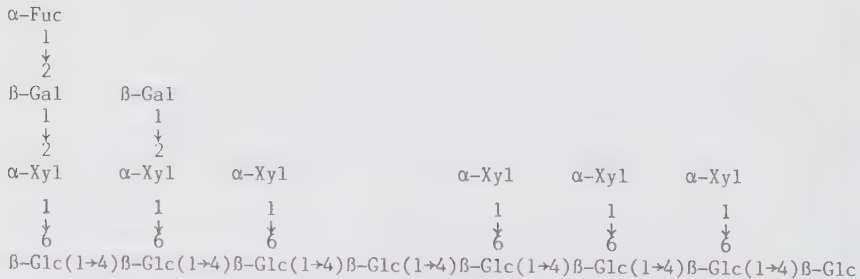


Abb. 42

Das Oligosaccharid scheint sich also aus einem enzymatisch nicht mehr weiter spaltbaren Heptasaccharid und einem Dekasaccharid zusammensetzen.

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich, ist der Galaktosegehalt der Fraktion 2 für die vorgeschlagene Struktur in Abb. 42 zu hoch. Es muß daher zusätzlich ein strukturell ziemlich ähnliches Oligosaccharid vorhanden sein, das in etwa das gleiche Molekulargewicht besitzt. Man könnte sich vorstellen, daß anstelle der terminalen Galaktose und der Fucose (1→2)-Galaktose-Gruppierung, zwei Galaktose-(1→2)-Galaktose-Einheiten am Xyloglucan-Grundgerüst hängen. Solche Galaktose-(1→2)-Galaktose-Gruppen wurden auch in einem Xyloglucan aus Jojoba-Samen (92) gefunden.

Die Strukturvorschläge für die Xyloglucan-Oligosaccharide (Abbildungen 40,41,42), die aufgrund der Ergebnisse der Methylierungsanalysen gemacht wurden, berücksichtigen die vermutlich vorhandenen Acetylgruppen (s. VI.8.) nicht.

VI.8. Kernresonanzspektroskopie

VI.8.1. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Hochkomplex aufgebaute Makromoleküle sind für den Einsatz von NMR-spektroskopischen Methoden nur beschränkt geeignet. Zu viele Resonanzen im nichtanomeren Bereich, aber teilweise auch im anomeren Bereich, führen zu Überlappungen und machen eine gezielte Interpretation meist unmöglich.

Wie aus Abb. 43 hervorgeht, traf dies auch auf unser Polysaccharid zu. Im ppm-Bereich von 70-76 erschien ein Berg von unaufgelösten Signalen, die nur mehr annähernd zugeordnet werden konnten. Zur Bestimmung der Konfiguration der einzelnen Glykosidbindungen erwies sich die ^{13}C -NMR-Spektroskopie aber trotzdem als unentbehrlich. So konnte für die anomeren Kohlenstoffatome der Glucose ($\sim 102,6$ ppm) und Galaktose ($104,9$ ppm) die β -Konfiguration ermittelt werden, während Xylose ($\sim 99,1$ ppm) α -verknüpft vorliegen muß. Auf eine Zuordnung der anderen Signale in diesem Bereich wurde verzichtet.

Eine Zuordnung der nicht anomeren Kohlenstoffatome des Glucan-Grundgerüsts versuchten wir durch Vergleiche mit ^{13}C -NMR-Daten von Cellotetraose, Cellulose und Isomaltose ($93,94$). Die relativ breiten Signale bei $79,4$ und $66,5$ ppm konnten den C-4 und C-6 Atomen der 1,4,6-verzweigten Glucose zugeordnet werden. Überlappend mit dem C-4-Atom der in C-6 Stellung glykosidierten Glucose ist das Signal bei $79,4$ ppm sehr wahrscheinlich dem C-4-Atom der (1 $\rightarrow$ 4)-kettenständigen Glucose zuzurechnen, während das Signal bei $60,4$ ppm vom entsprechenden C-6-Atom stammen könnte. Die Kohlenstoffatome C-2 und C-3 von (1 $\rightarrow$ 4)- und 1,4,6-gebundener Glucose müßten gleiche Verschiebungen ergeben, und wurden den Signalen von $73,1$ und $74,3$ ppm zugeordnet. Nicht eindeutig waren die C-5 Atome zu identifizieren.

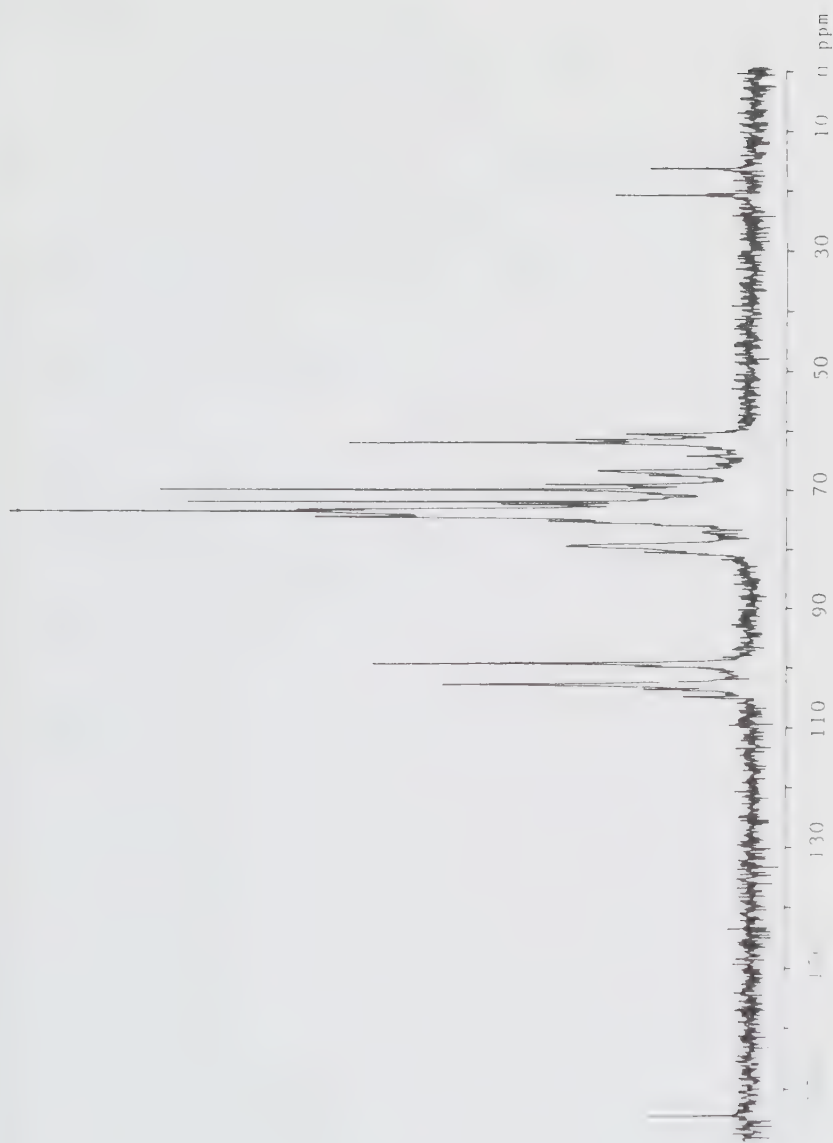


Abb. 3: ^{13}C -NMR-Spektrum von Polysaccharid EN 4 (50 MHz)-SR (18442,4 Hz)

Im Gegensatz zu den relativ breiten Signalen der Glucose wies die Xylose schmale Resonanzen mit großer Intensität auf. So war die Resonanz bei 61,8 ppm eindeutig als C-5-Atom der Xylose zu identifizieren, während die Kohlenstoffatome C-2, C-3 und C-4 wohl den Signalen bei 71,8, 73,4 und 69,76 ppm zuzurechnen sind. Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, konnte eine relativ gute Übereinstimmung mit dem nicht reduzierenden Zucker eines Xylose-Disaccharides (95) bzw. α -Me-Xylose festgestellt werden.

Die übrigen Zucker des Polysaccharides, ausgenommen das C-6-Atom der Fucose bei 16,5 ppm, konnten im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht zugeordnet werden.

Signale bei 174 ppm für eine C=O-Gruppe und bei 20,6 ppm für eine Methylgruppe sollten von einer Estergruppierung stammen. Da bei acetylierten Mannanen für die Acetylgruppe fast identische Verschiebungen gefunden wurden (96), könnten die beiden Resonanzen Acetatgruppen zugeordnet werden.

Tabelle 24: ^{13}C -NMR-Daten des Xyloglucangrundgerüsts von Polysaccharid EN 4 im Vergleich mit geeigneten Modells-substanzen

Substanz	Shiftwerte	Chemische Verschiebung in ppm					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -Me-Xylose nach SHASKOV (65)		100,6	72,3	74,3	70,4	62,0	-
Xylose-Disaccharid nach KOVAC (Ring A, Abb. 44)		99,1	72,7	74,2	70,7	62,6	-
Xylose aus dem Poly=saccharid EN 4		99,16	71,8	73,4	69,76	61,8	-
Cellotetraose (93)		103,2	73,8	75	79,3	75,7	60,9
Cellulose (93)		102,7	73,2	74,9	80,1	75,1	60,6
(1 $\rightarrow$ 4)- β -Glucose aus dem Polysaccharid EN 4		102,6	73,1	74,3	79,4	*	60,3
1,4,6- β -Glucose aus dem Polysaccharid EN 4		102,6	73,1	74,3	79,4	*	66,5
α -Isomaltose (94)		97,2	75,3	77,2	70,7	75,5	67,2

* nicht zuzuordnen

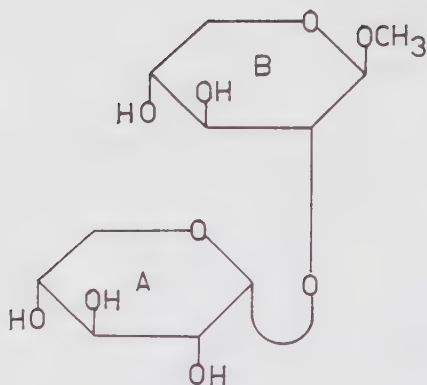


Abb. 44

Xylose-Disaccharid nach KOVAC (88)

VI.8.2. ^1H -NMR-Spektroskopie

Durch ein 500 MHz Protonenspektrum der Substanz EN 1 wurden die über ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelten Konfigurationsverhältnisse der Hauptzuckerkomponenten bestätigt. So konnten die anomeren Protonen für die α -Xylose und β -Glucose als Signale bei 4,96 ppm und ungefähr 4,5 ppm gefunden werden. Die von den übrigen Signalen abgesonderte Resonanz bei 5,3 ppm war durch Vergleich mit Literaturdaten dem H-1-Atom der α -Fucose zuzuordnen. Da andere Signale in diesem Bereich fehlten, -möglicher Hinweis auf α -gebundene Hexosen-, war anzunehmen, daß die Galaktose in β -Konfiguration vorliegt.

Die Methylgruppen des Essigsäureesters und der Fucose waren (96,97) durch scharfe Signale bei 2,14 ppm und 1,26 ppm gekennzeichnet. Die letzten beiden Signale konnten auch in einem 80 MHz Protonenspektrum von Polysaccharid EN 4 bei 2,14 und 1,3 ppm identifiziert werden. Wegen der im übrigen schlechten Auflösung war hier eine Zuordnung der anomeren Zuckerprotonen nicht möglich.

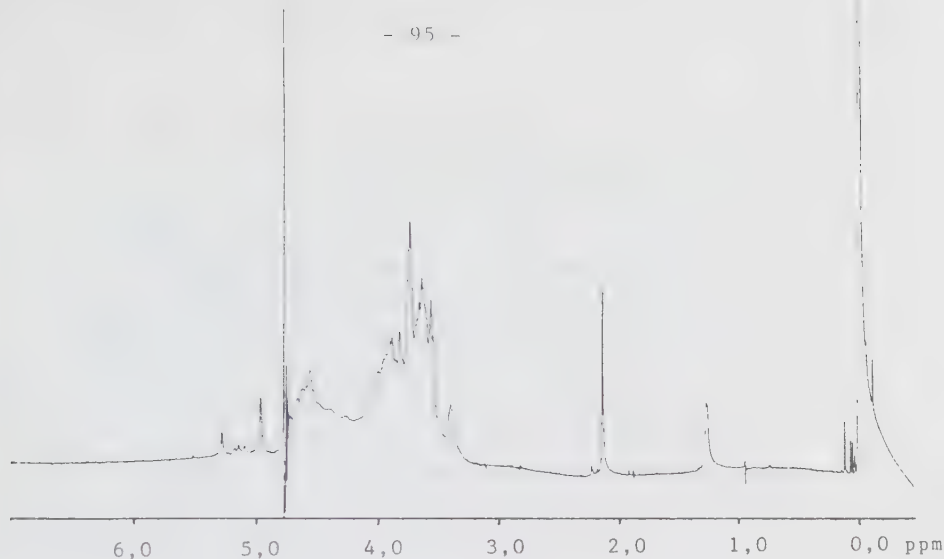


Abb. 45 ^1H -NMR-Spektrum von Polysaccharid EN 1 (500 MHz)
SR (6642,72 Hz)

Tabelle 25: ^1H -NMR-Daten des Polysaccharides EN 1 im Vergleich zu Modells-substanzen

Substanz	Polysaccharidkomponenten/Verschiebungen in ppm			
	Fucose p	Xylose p	Glucose p	Acetylgruppe
$\alpha\text{-L-Fuc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Galp}$	5,2	-	-	-
1	5,3 (H-1)	-	-	-
(97)	1,24 (CH ₃)	-	-	-
3				
GalNAc				
Arabinoxyloglucan aus Nicotiana tabacum (98)	-	5,05 4,92 (H-1)	4,52 (H-1)	-
Polysaccharid EN 1	5,3 (H-1) 1,26 (CH ₃)	4,96 (H-1)	4,5 (H-1)	2,14 (CH ₃)

VI.9. Enzymatische Behandlung der Xyloglucan-Oligosaccharide mit α -L-Fucosidase

Gereinigte α -L-Fucosidase wird aufgrund ihrer großen Enzymspezifität vielfach (99) zur Bestimmung der Konfiguration von Fucose in Zuckerpolymeren verwendet. Wie THORPE und Mitarbeiter (99) feststellten, ist aber der Erfolg der enzymatischen Hydrolyse vom Molekulargewicht des Substrates abhängig. So waren höher molekulare Glykoproteine, die aus dem Magensaft oder aus Leberkarzinomen isoliert wurden, gegenüber der α -L-Fucosidase resistent, während aus Oligosacchariden mit bis zu 13 Zuckereinheiten noch α -Fucose freigesetzt wurde. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Untersuchungen. Die Behandlung des Nativpolysaccharides mit α -Fucosidase brachte im Vergleich zum unbehandelten Fuco-galakto-xyloglucan keine eindeutigen Ergebnisse. Aus den Xyloglucan-Oligosacchariden hingegen, die durch Endo-(1 $\rightarrow$ 4)- β -Glucanase-Abbau erhalten wurden, konnte selektiv α -Fucose freigesetzt werden. Die α -Konfiguration der Fucose konnte also auch hier (siehe Kapitel NMR-Untersuchungen) bestätigt werden.

VI.10. Bestimmung des Acetylgehaltes von Polysaccharid EN 4

VI.10.1. Gaschromatographische Bestimmung (100)

Polysaccharid EN 4 wurde mit 0,05 bzw. 0,5 N NaOH-Lösung zwölf Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, anschließend mit verdünnter Salzsäure angesäuert (pH 3,5) und die freigesetzte Essigsäure mit Ethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden unter N_2 -Begasung zur Trockene eingengt und der Gaschromatographie unterworfen. Trotz mehrfacher Wiederholung mit jeweils veränderten Hydrolysebedingungen gelang es nicht die Essigsäure mit dieser Methode nachzuweisen. Verantwortlich dafür dürfte die große Flüchtigkeit dieser Säure sein.

VI.10.2. Gehaltsbestimmung über ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Im ^{13}C -NMR-Spektrum konnten, wie im entsprechenden Kapitel beschrieben, zwei Signale bei 174 und 20,5 ppm als Carbonyl- bzw. Methylgruppe der Essigsäure identifiziert werden. Ebenso konnte die Resonanz bei 16,5 ppm dem C-6-Atom, also der Methylgruppe, der Fucose zugeordnet werden. Durch Vergleich der Intensität bzw. der Integrale der beiden CH_3 -Signale, konnte ein Verhältnis von Acetylgruppen zu Fucose von 1,2:1 ermittelt werden. Berücksichtigt man den Gehalt an Fucose, der aus der Zuckeranalyse bekannt ist, so muß das Polysaccharid ca. 8% Acetylgruppen enthalten.

VI.10.3. Lokalisierung der Acetylgruppen

Das ^1H -NMR-Spektrum des Nativpolysaccharides zeigte einen scharfen Peak bei 2,14 ppm, so daß anzunehmen war, daß die Acetylgruppen in einer einzigen Verknüpfungsart im Polysaccharid vorzufinden sind. Daher wurde das Polysaccharid EN 4 mit Methylvinylether in Gegenwart von Toluolsulfonsäure als Katalysator (101) behandelt und anschließend das Reaktionsprodukt der Methylierungsanalyse ausgesetzt. Nach Hydrolyse, Reduktion und Acetylierung wurden die partiell methylierten Alditolacetate gaschromatographisch aufgetrennt. Anstelle eines einzigen Peaks erhielten wir eine ganze Reihe, so daß keine vernünftige Interpretation möglich war.

Neben dieser gängigen Methode zur Lokalisierung von Acetylgruppen in Polysacchariden, die auf NORMANN und BELDER (101) zurückgeht, wird in der Literatur noch eine andere chemische Methode beschrieben, die von BOVENG (102) entwickelt wurde und kürzlich von CORRERA (103) etwas vereinfacht wurde.

Anstelle des Methylvinylethers wird das partiell acetylierte Polysaccharid bei dieser Methode mit Phenylisocyanat umgesetzt, wodurch die frei vorliegenden Hydroxylgruppen in die entsprechenden Phenylcarbamate überführt werden. Das so erhaltene Polysaccharidderivat wird nun desacetyliert und danach mehrmals permethyliert (MeJ/AgO). Nach der anschließenden Abspaltung der Carbamoylschutzgruppen wird das partiell methylierte Polysaccharid hydrolysiert, das entstandene Zuckergemisch in die Alditolacetatform überführt und die einzelnen partiell methylierten Alditolacetate mittels GC-MS identifiziert.

VI.11. Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach den durchgeführten Analysen sollte es sich bei den beiden Polysacchariden EN 1 und EN 4 um Fuco-galakto-xylo-glucane handeln, die teilweise acetyliert sind.

Die Methylierungsanalyse und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigen eine $(1\rightarrow4)$ - β -Glucanhauptkette, die zu ca. 65% in Position C-6 verzweigt ist.

Die Seitenketten sind relativ unterschiedlich zusammengesetzt und haben eine maximale Kettenlänge von 3 Zuckereinheiten. Im einfachsten Falle ist terminale Xylose direkt am C-6 des Glucangerüsts gebunden. Daneben sind aber auch Galaktose- $(1\rightarrow2)$ -Xylose-, Fucose- $(1\rightarrow2)$ -Galaktose- $(1\rightarrow2)$ -Xylose- und Galaktose- $(1\rightarrow2)$ -Galaktose- $(1\rightarrow2)$ -Xylose Seitenketten vorhanden. Aufgrund der isolierten Oligosaccharide kann man annehmen, daß die Polysaccharide größtenteils aus sich wiederholenden Einheiten von Hepta- und Dekasacchariden aufgebaut sind.

Da Xyloglucane aus Pflanzenteilen normalerweise mit Lauge extrahiert werden, können im Nativpolysaccharid vorliegende Acetylgruppen nicht erfaßt werden. Darauf zurückzuführen ist wohl die Tatsache, daß in der Literatur darüber niemals berichtet wurde. ALBERSHEIM (104) hingegen konnte bei Xyloglucanen, die aus Gewebekulturen isoliert wurden, Acetylgruppen feststellen.

Das unterschiedliche Molekulargewicht der beiden Polysaccharide EN 1 und EN 4 könnte auf Aggregatbildung, wie sie bei Xylanen beschrieben ist, zurückzuführen sein. Es sind aber auch zwei Polysaccharide mit unterschiedlichem Molekulargewicht möglich. Aufgeklärt werden konnte dieses Problem nicht.

In der Literatur sind bisher zwei Typen von Xyloglucanen beschrieben worden (105). Beim ersten Typ handelt es sich um sogenannte Amyloide. Diese stellen in erster Linie Reservestoffe dar. Sie wurden in relativ großen Mengen

aus Samen von *Tamarindus indica* (106), *Tropeolum majus* (107), *Brassica campestris* (108) und *Brassica alba* (109) isoliert. Als Zuckerbestandteile sind hier Glucose, Xylose und Galaktose nachzuweisen. Der andere Xyloglucan-Typ wird als Zellwandbestandteil betrachtet und enthält neben den oben angeführten Zuckern zusätzlich noch Fucose. Solche Polysaccharide wurden aus Sykamor- (*Acer pseudoplatanus*)-Gewebekulturen, der Sojabohne (110) dem Jojoba-Samen (92) und aus *Phaseolus mungo* (111) gewonnen.

Wegen der großen strukturellen Ähnlichkeit dieser Fucogalaktoxyloglucane mit unseren Polysacchariden kann man diese dem zweiten Typ zuordnen.

Wie bereits erwähnt, isolierten ALBERSHEIM und Mitarbeiter ein Xyloglucan aus *Acer pseudoplatanus*-Gewebekulturen (19). Ein nahezu identisches Polysaccharid fand WILDER (21) in *Phaseolus vulgaris*-Gewebekulturen. In beiden Fällen konnte das Xyloglucan im Nährmedium, aber auch als Bestandteil des Zellmaterials nachgewiesen werden.

Aufgrund der strukturellen Charakterisierung sollten die Polysaccharide (1 $\rightarrow$ 4)- β -Glucanhauptketten besitzen, die in Position C-6 mit terminalen Xylose-Einheiten bzw. mit einzelnen Fucose-(1 $\rightarrow$ 2)-Galaktose-(1 $\rightarrow$ 2)-Xylose-Seitenketten verknüpft waren.

Galaktose-(1 $\rightarrow$ 2)-Xylose-Seitenketten, wie sie für die Xyloglucane aus den Echinacea-Gewebekulturen nachgewiesen werden konnten, waren im Platanen-Xyloglucan nicht nachweisbar.

Enzymatische Abbaureaktionen des ALBERSHEIM-Xyloglucans führten zur Darstellung von Penta-, Hepta- und Nonasacchariden. Heptasaccharide derselben Struktur wiesen wir auch als Bestandteile unserer Polysaccharide EN 1 und EN 4 nach. Anstelle eines Nonasaccharides erhielten wir durch enzymatische Hydrolyse ein Dekasaccharid, das sich vom ALBERSHEIM-Nonasaccharid durch eine zusätzliche terminale Galaktose-Einheit unterscheidet.

TEIL B ISOLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG EINES XYLOGLUCANS AUS DEM ZELLMATERIAL DER ECHINACEA GEWEBEKULTUR

I.1. Isolierung von Polysaccharidfraktionen aus dem Zellmaterial

Nachdem die Isolierung und Strukturaufklärung eines Xyloglucans aus dem Nährmedium gelungen war, sollte untersucht werden, ob dieses Xyloglucan auch einen Bestandteil des Zellmaterialies darstellt. Xyloglucane bilden, wie aus Modellvorstellungen über den Zellwandaufbau von ALBERSHEIM und Mitarbeitern hervorgeht, relativ stabile H-Brückenbindungen zu Cellulosefibrillen aus, so daß ihre Ablösung aus dem Zellwandkomplex nur mit starken Laugen oder 8 M Harnstofflösungen (19) möglich ist.

Wir haben das Zellmaterial vom Nährmedium abgetrennt, mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Das getrocknete Material wurde anschließend einer Mazeration mit wässriger 4N NaOH-Lösung bei 4°C unterworfen. Der unlösliche Bestandteil wurde abgenutscht und das Filtrat der in Kapitel (Teil A.I) beschriebenen Fällungsmethodik unterworfen. Als Rohfraktionen erhielten wir so ein 1:1 und ein 1:4 Fällungsprodukt.

I.2. Darstellung einer Xyloglucan-Einzelkomponente (EZ1) aus der 1:1 Fällung

Wie bei der Isolierung des Fuco-galakto-xyloglucans aus dem Nährmedium, wurde die 1:1 Rohfraktion einer Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose CL 6 B unterworfen. Durch Elution mit demineralisiertem Wasser erhielten wir eine Neutralfraktion mit positiver optischer Drehung, die nach erschöpfender Dialyse gegen demineralisiertes Wasser gefriergetrocknet wurde.

In Tabelle 26 ist die Zuckerzusammensetzung dieser Neutralfraktion EZ wiedergegeben. Während in den Polysacchariden aus der Nährlösung Mannose als Zuckerbestandteil nicht nachweisbar war, fanden wir hier einen relativ großen Mannosegehalt. Außerdem war auch der Glucose- und Galaktoseanteil stark erhöht.

Bei einer nachfolgenden Gelchromatographie an Sephacryl S 400 zeigte sich, daß die Neutralfraktion EZ aus zwei Komponenten bestand. Da beide Komponenten ein ziemlich ähnliches Molekulargewicht aufwiesen, war eine Trennung über Gelfiltration oder Anionenaustauschchromatographie nicht möglich. Erst eine Adsorptionschromatographie über Cellulose CC 31 (83) brachte den erwünschten Trenneffekt. Dazu wurde die Xyloglucan-hältige Neutralfraktion EZ in Wasser gelöst, auf einer Säule mit Cellulose CC 31 aufgegeben und mit ca. zwei Säulenvolumina demineralisierten Wassers eluiert. Das Xyloglucan mußte laut Literaturangaben selektiv am Säulenmaterial adsorbiert bleiben, während das andere Polysaccharid ungebunden eluiert wurde.

Durch anschließende Elution mit 1 N Natronlauge konnte das Xyloglucan von der Cellulose wieder abgelöst werden. Die alkalischen Fraktionen wurden mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt, dialysiert und gefriergetrocknet.

Nach einer weiteren Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose mit H_2O als Fließmittel und einer anschließenden Gelfiltration an Sephacryl S 400 mit 0,2 N NaCl-Lösung als Elutionsmittel, wurde das gereinigte Xyloglucan EZ 1 dialysiert und gefriergetrocknet.

Zur Überprüfung der Homogenität bzw. zur Molekulargewichtsbestimmung führten wir eine HP-GPC-Analyse durch. Wie aus Abb. 46 ersichtlich, erhielten wir einen nahezu symmetrischen Peak, so daß die Einheitlichkeit des Polysaccharides EZ 1 angenommen werden konnte. Durch Vergleich mit Dextranen wurde ein mittleres Molekulargewicht von 55000 bestimmt.

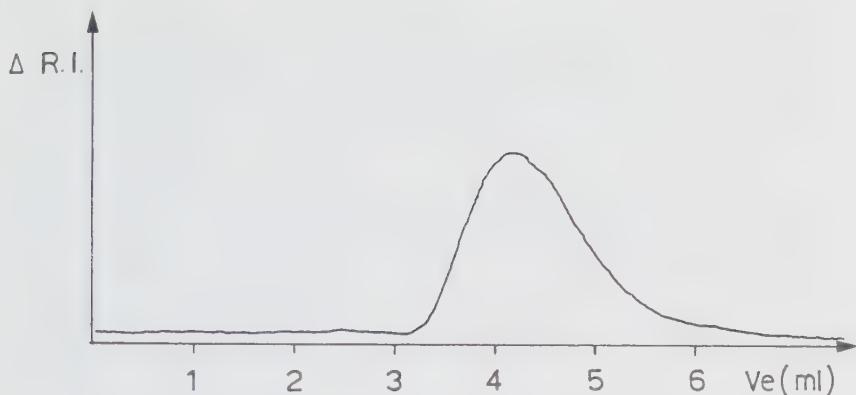


Abb. 46

HP-GPC-Chromatographie des über Cellulose CC 31 gereinigten Polysaccharides EZ 1

Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500

Eluens: 0,2 M Na-phosphatpuffer pH 6

Detektion: Refraktometer

I.3. Darstellung einer Einzelkomponente aus der 1:4

Fällung

Aus der 1:4 Fällung konnte über Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose 6 CL B ein annähernd homogenes Polysaccharid mit einem mittleren Molekulargewicht von 10000 gewonnen werden. Da bei der Zuckeranalyse ausschließlich Glucose, Galaktose und Mannose im molaren Verhältnis 9:4:6 nachzuweisen waren, könnte es sich um ein Galakto-gluco-mannan handeln. Weitere Untersuchungen an diesem Polysaccharid wurden nicht durchgeführt.

Tabelle 26: Molare Zuckerzusammensetzung der durch Anionenaustauschchromatographie aus der 1:1 Fällung erhaltenen Neutralfraktion EZ und des über Cellulose CC 31 gereinigten Xyloglucans EZ 1

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: SP 2330, T=225°C
Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure, 1,5 h, 121°C

	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EZ	Spuren	Spuren	1,0	2,1	1,5	4,0
EZ 1	0,1	Spuren	1,0	Spuren	0,4	1,6
EN 1 (Xyloglucan aus Nährmedium)	0,1	-	1,0	-	0,4	1,6

Vergleicht man die Zuckerzusammensetzung des gereinigten Xyloglucans EZ 1 mit dem Xyloglucan EN 1 aus der Nährlösung, so kann man für beide Polysaccharide nahezu identische molare Verhältnisse feststellen.

I.4. Methylierungsanalyse des gereinigten Xyloglucans EZ 1

Das Polysaccharid wurde nach HAKOMORI methyliert, anschließend hydrolysiert, reduziert und in die Alditolacetate überführt. Die Auftrennung der permethylierten Alditolacetate erfolgte über eine OV 225-Kapillarsäule bei 210°C. Zur Zuordnung der einzelnen Peaks wurden ihre Retentionszeiten mit denen verglichen, die bei den GC-MS-Analysen der permethylierten Alditolacetate aus den Polysacchariden EN 1 und EN 4 bestimmt worden waren. Dabei konnten die in Tabelle 27 aufgelisteten Verbindungen identifiziert werden.

Tabelle 27: Methylierungsanalyse des Xyloglucans EZ 1

Permethylierte Alditolacetate	molares Verhältnis #
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol *	1,6
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-fucitol *	
1,5-Di-O-acetyl-1,3,4,6-tetra-O-methyl-galaktitol	0,26
1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-xylitol	0,43
1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-galaktitol	0,33
1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol	1,0
1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-glucitol	2,0

Die Werte wurden nach SWEET korrigiert * nicht getrennt

Wie aus Tabelle 27 ersichtlich, beträgt das Verhältnis von (1→4)-verknüpfter Glucose zu 1,4,6-verknüpfter Glucose 1:2. Man kann also auch hier ein (1→4)-Glucan-Grundgerüst annehmen, das zu ca. 65% in Position C-6 verzweigt ist.

Der Gesamtanteil an terminalen Zuckern entspricht in etwa dem Gehalt an Glucoseverzweigungspunkten. (1→2)-verknüpfte Galaktose und (1→2)-verknüpfte Xylose bilden wahrscheinlich Seitenkettenglieder zwischen terminaler Galaktose bzw. terminaler Fucose und dem Glucangrundgerüst.

Die molaren Verhältnisse stimmen erstaunlich gut mit denen überein, die für das Xyloglucan aus dem Nährmedium bestimmt worden sind. Man kann also davon ausgehen, daß das Polysaccharid EZ 1 in struktureller Hinsicht mit den Xyloglucanen aus dem Nährmedium vollständig übereinstimmt. Acetylgruppen konnten wegen der alkalischen Extraktion nicht mehr nachgewiesen werden.

TEIL C ISOLIERUNG UND PARTIELLE CHARAKTERISIERUNG EINES XYLOGLUCANS AUS DER DROGE ECHINACEA PURPUREA

I.1. Isolierung von Rohpolysaccharidfraktionen

Um zu prüfen, ob dieses oder ein ähnlich aufgebautes Xyloglucan auch einen Bestandteil der Nativ-Pflanze darstellt, untersuchten wir das Zellwandmaterial von Echinacea purpurea. Zur Abtrennung von lipophilen Inhaltsstoffen wurde die gepulverte Droge erschöpfend mit Petrolether und Methanol ausgezogen. Die getrocknete Droge wurde anschließend einer Extraktion mit 0,5 N Natronlauge unterworfen. Dadurch sollten wasserlösliche Polysaccharide, aber auch Hemicellulosen, wie zum Beispiel saure Xylane entfernt werden. Aus diesem wässrig-alkalischen Extrakt gelang es PROKSCH, ein Heteroxytan und ein Arabinorhamnogalaktan (9), zwei Polysaccharide mit immunstimulierender Aktivität, zu isolieren. Zur Extraktion weiterer Polysaccharidfraktionen, die mit 0,5 N Natriumlauge aus dem Zellwandverband nicht ablösbar sind, wurde der Drogenrückstand mit 4N NaOH-Lösung über Nacht bei 4°C mazeriert, das unlösliche Material am nächsten Tag abfiltriert und die alkalische Lösung nach dem Reinigungsverfahren nach CALDES (25) aufgearbeitet. Über fraktionierte Alkoholfällungen erhielten wir auf diese Weise eine 1:0,5, eine 1:1 und eine 1:4 Polysaccharidfraktion. Da die 1:0,5 Fällung mengenmäßig bei weitem den Hauptanteil darstellte, wurde diese näher untersucht.

I.2. Darstellung eines gereinigten Xyloglucans EH 1 aus der 1:0,5 Fällung

Die Auftrennung bzw. Reinigung des Xyloglucans erwies sich als ähnlich kompliziert, wie beim Xyloglucan aus dem Zellmaterial der Gewebekultur. Durch eine Anionenaustauschchromatographie der 1:0,5 Fällung an DEAE Sepharose CL 6 B mit H₂O dem. als Eluens wurden die Neutralpolysaccharide

EH abgetrennt. Da die Zuckeranalyse einen großen Mannose-Gehalt ergab, erfolgte die weitere Reinigung wiederum über Adsorptionschromatographie an Cellulose CC 31, gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephrose und einer Gelchromatographie an Sephacryl S 400. Das so gereinigte Polysaccharid EH 1 wurde über eine HP-GPC-Analyse auf Einheitlichkeit überprüft. Ein symmetrischer Peak ließ auf Einheitlichkeit (Abb.47) des Polysaccharides schließen. Nach Eichung mit Dextranen erhielten wir für das Polysaccharid EH 1 ein mittleres Molekulargewicht von 79500.

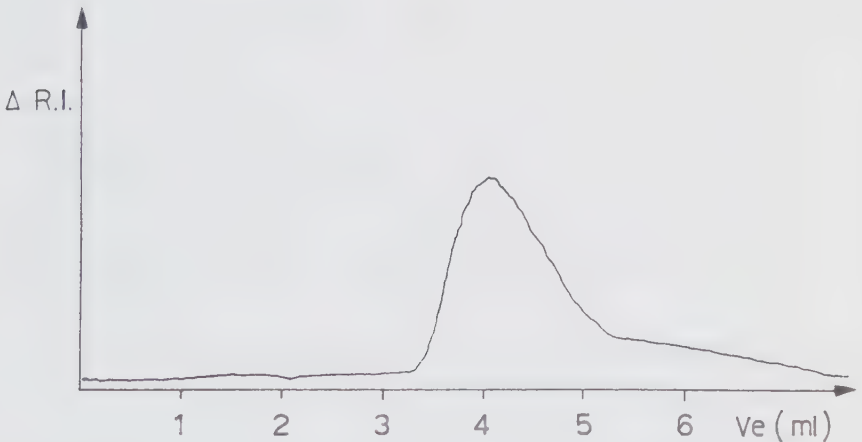


Abb. 47

HP-GPC-Chromatographie des über Cellulose CC 31 gereinigten Polysaccharides EH 1

Säulensystem: μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500

Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6

Detektion: Refraktometer

Tabelle 28: Molare Zuckerzusammensetzung der 1:0,5
Fällung, der Neutralfraktion EH und des ge=
reinigten Xyloglucans EH 1

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: SP 2330
T = 225°C
Hydrolysebedingungen: 2 N Trifluoressigsäure, 1,5h, 121°C

	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
1:0,5 Fällung	0,14	0,17	1,0	0,59	0,5	1,04
PS-Fraktion EH	0,3	-	1,0	1,07	0,62	1,5
Xyloglucan EH 1	0,17	Spuren	1,0	-	0,36	1,45

Tabelle 28 zeigt, daß nach der ersten Ionenaustauschchromatographie der Mannose- und Glucosegehalt stark zunahm, während die übrigen molaren Zuckerverhältnisse annähernd gleich blieben. Nach einer Adsorptionschromatographie an Cellulose war Mannose im Xyloglucan nicht mehr nachweisbar und der Galaktose-Gehalt hatte stark abgenommen.

I.3. Methylierungsanalyse des Xyloglucans EH 1

Die Methylierungsanalyse zeigt wiederum ein (1→4)-gebundenes Glucangrundgerüst, das in Position C-6 Verknüpfungspunkte aufweist. Konnte bei der Permethylierungsanalyse der Xyloglucane aus der Gewebekultur für kettenständige und verzweigte Glucose ein Verhältnis von 1:2 ermittelt werden, so fanden wir für das Nativ-Pflanzen-Polysaccharid ein Verhältnis von 1:2,4.

In entsprechendem Maße waren auch größere Anteile an Seitenkettenzwischengliedern, nämlich (1→2)verknüpfte Galaktose und Xylose nachweisbar. Weshalb mehr Glucose-Verzweigungspunkte als terminale Xylose, Fucose und Galaktose vorhanden waren, könnte auf Verluste bei der Methylierungsanalyse zurückzuführen sein.

Tabelle 29: Methylierung des Xyloglucans EH 1

Permethylierte Alditolacetate	molares Verhältnis #
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-xylitol *	1,3
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-fucitol *	
1,5-Di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-galaktitol	0,46
1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4-di-O-methyl-xylitol	0,74
1,2,5-Tri-O-acetyl-3,4,6-tri-O-methyl-galaktitol	0,65
1,4,5-Tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methyl-glucitol	1,0
1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-2,3-di-O-methyl-glucitol	2,4

Die Werte wurden nach SWEET (57) korrigiert

* nicht getrennt

Im Gegensatz zu den Xyloglucanen aus der Gewebekultur scheint das isolierte Polysaccharid EH 1 einen höheren Verzweigungsgrad, aber sonst einen ziemlich ähnlichen Aufbau zu besitzen.

TEIL D VERGLEICH DER POLYSACCHARIDE AUS DER GEWEBE=
KULUR MIT DENEN, DIE AUS DER INTAKTEN PFLANZE
ISOLIERT WERDEN KONNTEN

Aus der Droge *Echinacea purpurea* konnten insgesamt drei Polysaccharide in reiner Form dargestellt bzw. strukturell charakterisiert werden.

Zwei davon, ein Arabinorhamnogalaktan und ein Heteroxyylan, wurden von PROKSCH (9) durch Extraktion mit 0,5 N Natronlauge gewonnen, das dritte, ein Xyloglucan, wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Extraktion mit 4 N Natronlauge isoliert.

Nach den Untersuchungen von PROKSCH (9) besteht das Arabinorhamnogalaktan mit einem mittleren Molekulargewicht von 450000 aus den vier Hauptkomponenten Rhamnose, Arabinose, Galaktose und Glucuronsäure im Verhältnis von 0,8 : 0,6 : 1 : 0,6. Die Hauptkette wird von (1→2)-verknüpfter Rhamnose und (1→4)-verknüpfter Galaktose im molaren Verhältnis von 1:1 gebildet. Die Rhamnose stellt in Position C-4 Verknüpfungspunkte zu Seitenketten dar, die aus Rhamnose, Arabinose, Xylose und Glucose aufgebaut sind. Sowohl in der Hauptkette, als auch in den Seitenketten, sind Glucuronsäurereste vorhanden.

Eine vollständig andere Struktur weist demgegenüber das Arabinogalaktan AG auf, das aus dem Zellkulturmedium isoliert werden konnte. Das Polysaccharid AG mit einem mittleren Molekulargewicht von 75000, baut sich aus einem Arabinogalaktanteil, einem Rhamnogalaktanteil und einem Arabinanteil auf, die wahrscheinlich über kovalente Bindungen miteinander verbunden sind.

Der Arabinogalaktanteil besteht aus einer (1→3)-verknüpften Galaktanhauptkette, die in Position C-6 Verzweigungen zu (1→6)-gebundenen Galaktanseitenketten aufweist. Diese wiederum sind zu fast 70% in Position C-3 mit terminaler Arabinose verknüpft. Einzelheiten über den

strukturellen Aufbau dieses Polysaccharides AG sind dem Kapitel V zu entnehmen.

Das zweite von PROKSCH isolierte Polysaccharid mit einem mittleren Molekulargewicht von 35000, war erwartungsgemäß in der Gewebekultur nicht zu finden.

Zellen, die in Suspension kultiviert werden, besitzen ausschließlich Primärzellwandanteile, da sie keiner Differenzierung unterworfen sind. Demgegenüber wird die Zellwand der differenzierten Pflanzenzelle aus mehreren "Schichten" aufgebaut. Man unterscheidet eine Primärwand, die während der Wachstumsphase der Zelle gebildet wird, und eine Sekundärwand, die nach Abschluß des Wachstums aus Teilen der Primärwand gebildet bzw. dieser aufgelagert wird. Primär- und Sekundärwand werden durch die sogenannte Übergangslamelle miteinander verbunden. Nach außen hin grenzt die Primärwand an die Mittellamelle, die die Verbindung zu den anderen Zellen darstellt.

Xylane, wie das von PROKSCH aus der Droge isolierte Heteroxytan, sind typische Bestandteile der Sekundärzellwand und daher als Bestandteile bzw. Stoffwechselprodukte der Primärzellwand in Suspension kultivierter Zellen kaum zu erwarten. Nur in einem einzigen Fall (18,19,20), allerdings in sehr geringen Mengen, gelang es, aus der Primärwand von in Suspension kultivierten Zellen ein Glucuronoarabinoxylan zu isolieren.

Relativ gute strukturelle Übereinstimmung konnten wir zwischen dem Xyloglucan EH 1 aus der Droge und den Xyloglucanen EN 1, EN 4 und EZ 1 aus der Gewebekultur nachweisen. In jedem Fall liegt ein (1→4)-Glucangrundgerüst vor, das in Position C-6 Verzweigungspunkte zu terminaler Xylose bzw. Galaktose-(1→2)-Xylose- oder Fucose-(1→2)-Galaktose-(1→2)-Xylose-Seitenketten aufweist.

Das Xyloglucan aus der Droge unterscheidet sich von den Xyloglucanen aus der Gewebekultur ausschließlich durch

einen höheren Verzweigungsgrad der Glucanhauptkette. Zur Beantwortung der Frage, wo in der pflanzlichen Zellwand von *Echinacea purpurea*, die nachgewiesenen Polysaccharide lokalisiert werden müssen, kann man sich auf das von ALBERSHEIM vorgeschlagene Zellwandmodell beziehen. Dieses Modell, das den Aufbau der Primärzellwand in dikotylen Pflanzen darstellt, wurde aufgrund von Arbeiten an Sycamor- (*Acer pseudoplatanus*)-Gewebekulturen (18,19,20) entwickelt.

Da die Zellen der Gewebekultur keiner Differenzierung unterworfen sind und daher ausschließlich aus Primärzellwandmaterial aufgebaut sind, eignen sich diese im besonderen Maße für Strukturuntersuchungen der Primärzellwand. Dagegen ist es äußerst schwierig, aus der differenzierten Pflanzenzelle homogene Zellwandbestandteile, d.h. z.B. ausschließlich Bestandteile der Primärzellwand zu erhalten.

Aufgrund umfangreicher Untersuchungen (112), die an Zellmaterial aus verschiedenen Gewebekulturen bzw. Zellmaterial aus den entsprechenden intakten Pflanzen, durchgeführt wurden, hat ALBERSHEIM zwei Hypothesen aufgestellt:

- 1) Die Primärzellwand von in Suspension kultivierten Zellen ist in ihrer Struktur vergleichbar mit der Primärzellwand der differenzierten, intakten Pflanzenzelle
- 2) Dikotyle Pflanzen scheinen ziemlich ähnlich aufgebaute Primärzellwände zu besitzen, die sich großteils nur in der quantitativen Zusammensetzung der einzelnen Polysaccharidbausteine unterscheiden.

Wie aus Abb. 48 ersichtlich, scheinen die folgenden vier Polymer-Typen am Aufbau der Primärzellwand beteiligt zu sein:

ein hydroxyprolinreiches Glycoprotein, Cellulose, Hemicellulose und pektische Polysaccharide.

1) Die pektischen Polysaccharide scheinen ausschließlich kovalent miteinander verbunden zu sein. 2) Im Gegensatz dazu sind die Hemicellulosen, in erster Linie die Xyloglucane, über Wasserstoffbrücken an die fibrillären Cellulosemoleküle geknüpft. Zusätzlich scheinen aber zwischen den Xyloglucanen und den pektischen Polysacchariden auch kovalente Bindungen zu bestehen.

3) Über die Verknüpfung des Glycoproteinanteiles mit den übrigen Zellwandbestandteilen herrscht Unklarheit. MONRO und Mitarbeiter (113) nehmen an, daß das Glycoprotein über kovalente Bindungen mit den Cellulosefibrillen verbunden ist.

Dieses von ALBERSHEIM entworfene Modell gilt nicht für den Aufbau der Sekundärzellwand, deren Struktur äußerst vielfältig ist und sich von einem Zelltyp zum anderen stark unterscheidet.

Die von uns aus dem Nährmedium isolierten Xyloglucane EN 1 und EN 4, sowie das aus dem Zellmaterial gewonnene Xyloglucan EZ 1, müßten nach dem Modell von ALBERSHEIM aus dem der Cellulose nächstliegenden Bereich der Primärzellwand stammen. Das Arabinogalaktan AG, das ebenfalls aus dem Nährmedium der Echinacea-Gewebekultur dargestellt wurde, würde dagegen ein Bindeglied zwischen dem Hemicelluloseteil und dem Glycoproteinteil darstellen.

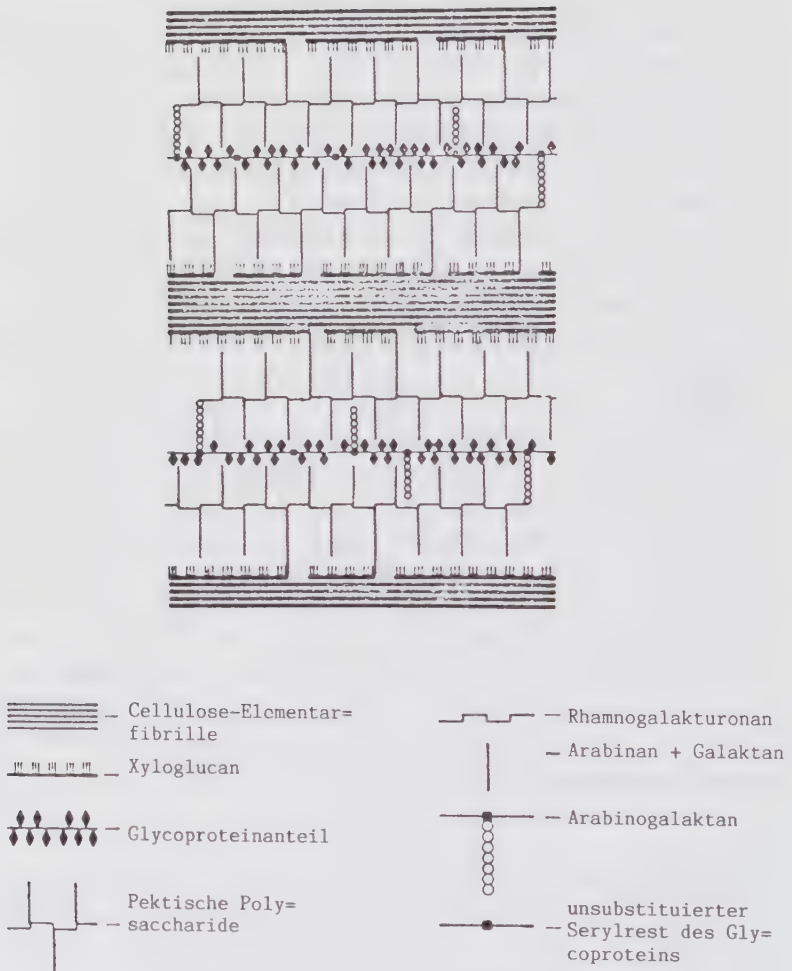


Abb. 48

Modell über den Aufbau der Primärzellwand nach ALBERSHEIM
(aus Plant Physiol. 51,194 (1973))

TEIL E IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DEN POLYSACCHARIDEN

I.1. Beschreibung der verwendeten Testsysteme

Als Screening-Methoden zur Lokalisierung und Anreicherung von Polysacchariden mit immunstimulierender Wirkung verwendeten wir als in vitro-Testsystem den Granulozytentest nach BRANDT (22) und als in vivo-Testsystem den Carbon-Clearance-Test.

I.1.1. Granulozyten-Test nach BRANDT (22)

Die Aufnahme und der stufenweise Abbau von körperfremden und teils körpereigenen Stoffen, ein als Phagozytose bezeichneter Vorgang, wird zwei Zelltypen zugeschrieben, den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten.

Die Phagozytoseleistung der Granulozyten läßt sich nach einer von BRANDT entwickelten Methode messen. Dabei werden aus Humanserum angereicherte Granulozytenfraktionen mit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) und der zu testenden Substanz für eine bestimmte Zeit inkubiert. Nach Fixierung und Anfärbung erfolgt die mikroskopische Auswertung, d.h. es wird die Anzahl von phagozytierten Hefepartikeln der einzelnen Zellen bestimmt. Aus der durchschnittlichen Anzahl von phagozytierten Hefepartikeln läßt sich dann der Phagozytoseindex ermitteln.

I.1.2. Carbon-Clearance-Test

Mit Hilfe dieses Testes, der von BIOZZI (114) entwickelt wurde, wird die Phagozytoseaktivität von Leber- und Milz-Makrophagen bestimmt. Dazu wird Mäusen Gelatine-stabilisierte Kohlesuspension intravenös injiziert, in bestimmten Zeitabständen aus dem retroorbitalen Venenplexus Blut entnommen und die Abnahme der Kohlekonzentration spektro=

photometrisch verfolgt. An der Elimination der Kohlepartikel aus dem Blut sind in erster Linie die Kupferschen-Sternzellen der Leber, zu ca. 10% aber auch Milzmakrophagen beteiligt.

Trägt man den Logarithmus der jeweiligen Kohlekonzentration (Extinktion) im Blut gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade, deren negative Steigung, als Regressionskoeffizient K bezeichnet, ein Maß für die Phagozytoseaktivität darstellt.

Appliziert man einer Versuchsgruppe von Tieren eine potentiell immunstimulierende Substanz und ermittelt anschließend die Carbon-Clearance, d.h. die Rate mit der die injizierten Kohlepartikel aus dem Blut eliminiert werden, so kann man durch Vergleich mit einer unbehandelten Gruppe auf die Phagozytosesteigerung durch die Testsubstanz schließen.

Eine Stimulierung ist zu erkennen, wenn das Verhältnis $K_{\text{Substanz}}/K_{\text{Kontrolle}} > 1$ ist, eine Suppression liegt vor, wenn das Verhältnis < 1 ist. Die Beurteilung der Wirksamkeit erfolgt zusätzlich mit sogenannten DSK-Werten. Ist der Quotient der Regressionskoeffizienten $\geq 1,5$, so wird der Substanz ein DSK-Wert von 2, d.h. eine starke Phagozytosestimulierung zugeschrieben. Ein Quotient von 1 bis 1,5 weist auf eine schwache Stimulierung hin und wird mit einer DSK-Note von 1 bewertet.

Tabelle 29: Prozentuelle Steigerung der Phagozytose
durch einzelne Polysaccharidfraktionen im
Granulozytentest nach BRANDT

Polysaccharid= fraktionen	Phagozytosewerte in Prozent bei Konz.					
	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ mg/ml
aus dem Zell- kulturmedium:						
1:1 Fällung	-	21,5%	27,8%	0	-	-
1:4 Fällung	-	15,4%	18,3%	13,5%	-	-
PS EN 1	17,6%	21,3%	28,1%	20,1%	9,3%	-
PS EN 4	-	10,8%	-4 %	-1,5%	-	-
PS AG	-	0,6%	3 %	10,8%	-	-
aus dem Zell= kulturmaterial:						
PS EZ 1	-	3 %	-6 %	14 %	10 %	6 %
aus der Nativ= pflanze:						
PS EH 1	2	% 8 %	7 %	11 %	2 %	-

- = nicht getestet

Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

Tabelle 30 : Einfluß von Polysaccharidfraktionen aus der Gewebekultur auf die Carbon-Clearance bei Mäusen

Verabreichung von jeweils einmal 10mg Substanz/kg Maus

Polysaccharidfraktion	$K_{\text{Substanz}} / K_{\text{Kontrolle}}^*$	DSK-Wert
1:1 Fällung	1,77	2
PS EN 1	1,6	2
PS EN 4	1,2	1
PS AG	1,4	1

* Die Regressionskoeffizienten wurden unter Berücksichtigung des Leber-, Milz- und Körpergewichtes der jeweiligen Maus nach DREWS (115) korrigiert.

I.2. Phagozytoseaktivität der Polysaccharide aus Echinacea purpurea-Gewebekulturen

Wie aus Tabelle 29 ersichtlich, zeigte die 1:1 Polysaccharidfraktion aus der Gewebekultur eine um ca. 10% höhere Phagozytosesteigerung, als die 1:4 Fällung. Dies stimmt mit den Erfahrungen überein, die in unserem Arbeitskreis gemacht wurden. 1:0,5- bzw. 1:1-Polysaccharidfraktionen aus verschiedensten Pflanzen ergaben immer höhere Phagozytoseraten, als entsprechende 1:4 Fällungen. Dasselbe Phänomen war auch bei den gereinigten Ionenaustauschfraktionen PS EN 1 und PS EN 4 zu beobachten. Polysaccharid EN 1, ein Fuco-galakto-xylo-glucan, zeigte mit durchschnittlich 25-30% aus mehreren Ansätzen, eine weit höhere Steigerung der Phagozytose, als das Polysaccharid EN 4, ebenfalls ein Fuco-galakto-xylo-glucan, das fast inaktiv war.

Im Vergleich zur 1:1 Rohpolysaccharidfraktion war allerdings bei gleichen Konzentrationsverhältnissen kein wesentlicher Wirkungsanstieg zu verzeichnen. Den entscheidenden Unterschied stellte aber die Löslichkeit der Produkte dar. Während Polysaccharid EN 1 ausgezeichnet wasserlöslich war, war die Rohfraktion aufgrund des hohen Anteiles an pektinartigen Polysacchariden nur schwer in Lösung zu bringen.

Das aus der 1:4 Fällung isolierte Arabinogalaktan war im Granulozytentest nur schwach wirksam.

Im Carbon-Clearance-Test konnten ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Das 1:1 Rohpolysaccharidgemisch und das gereinigte Neutralpolysaccharid EN 1 waren mit Regressionskoeffizienten, die 1,7 bzw. 1,5 mal höher waren als die der Kontrollgruppe, deutlich wirksam. Sie konnten mit einer DSK-Note von 2 beurteilt werden.

Die gereinigten Polysaccharide EN 4 (Fuco-galakto-xyloglucan) und AG (Arabinogalaktan) aus der 1:4 Fällung hingegen erreichten nur einen DSK-Wert von 1.

In beiden Testsystemen war also für das Polysaccharid EN 1 eine phagozytosesteigernde Wirkung nachzuweisen, während die Polysaccharide EN 4 und AG sich als nur schwach aktiv erwiesen.

Da die beiden Polysaccharide EN 1 und EN 4 offensichtlich den gleichen strukturellen Aufbau besitzen, muß die unterschiedliche Phagozytoseaktivität auf das unterschiedliche Molekulargewicht zurückzuführen sein.

Dies deckt sich auch mit Literaturangaben. So zeigten Dextrans mit einem mittleren Molekulargewicht von 90000 D (116) gute immunogene Eigenschaften, während solche mit einem Molekulargewicht von 50000 D schlechte Immunogene waren. Auch hoch immunogene Lipopolysaccharide (117/118), die durch Aggregation Molekulargewichte bis zu mehreren Millionen D besitzen, verlieren bei Desaggregation ihre

immunologische Wirkung. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei sauren Xylanen aus *Eupatorium perfoliatum* gemacht (34).

Aber auch Konformationsunterschiede müssen in Betracht gezogen werden. CHIHARA (119) postulierte, daß die Sekundär-oder Micell-Struktur von Polymeren für die immunologische Wirkung eine größere Rolle spielt, als die Primärstruktur.

Die Neutralpolysaccharide EZ 1 aus dem Zellmaterial der Gewebekultur und EH 1 aus der Nativ-Pflanze zeigten im Granulozytentest (siehe Tabelle 29) eine schwächere immunstimulierende Aktivität als das Polysaccharid EN 1 aus dem Nährmedium der Gewebekultur. Da alle drei Polysaccharide einen ziemlich ähnlichen Strukturaufbau besitzen, könnte den Acetylgruppen eine entscheidende Bedeutung für die immunologische Wirkung zukommen. So beschreiben JANN und WESTPHAL (120), daß Acetylgruppen in *Salmonella*-Lipopolysacchariden essentielle Strukturbestandteile für die immunologische Aktivität darstellen. Auch bei Kapselpolysacchariden aus *N.meningitidis* (121) wird der Antigencharakter entscheidend von den Acetylgruppen geprägt.

Wir spalteten daher die Acetatgruppen in Polysaccharid EN 1 durch alkalische Hydrolyse ab. Nach 48 stündiger Dialyse gegen demineralisiertes Wasser und anschließender Gefriertrocknung überprüften wir die Phagozytoserate des Hydrolyseproduktes im Granulozytentest. Im Vergleich zum unveränderten Polysaccharid EN 1 waren keine unterschiedlichen Steigerungsraten festzustellen. Trotzdem kann man eine immunologische Bedeutung der Acetylgruppen in Polysaccharid EN 1 nicht vollständig ausschließen. Zur Aufklärung dieses Problems müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

I.3. Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Polysacchariden

In der Literatur findet man neben der großen Anzahl der Bakterienpolysaccharide, die chemisch und pharmakologisch äußerst detailliert untersucht worden sind, in relativ bescheidenem Ausmaße auch Polysaccharide aus Pilzen, Flechten und Algen, für die eine immunologische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Bekannte Polysaccharide aus dieser Reihe sind z.B. das Lentinan, Pachymaran, Schizophyllan und Skleroglucan (122,123). Größtenteils handelt es sich um relativ einfach aufgebaute Glucane, aber auch immunologisch aktive Polysaccharide mit Mannan=grundgerüsten konnten gefunden werden (124). Bei Pflanzenpolysacchariden erwiesen sich Hemicellulose=fractionen aus Bambus (125), Arabinoxylglucane aus Weizenstroh (126), und Xylane aus Eupatorium und Echinacea (9,34) als immunologisch besonders aktiv.

Hingegen konnte in Übereinstimmung mit unseren Resultaten für Arabinogalaktane aus der Mistel (77) und Larix-Arten (127) keine oder nur eine geringfügige immunstimulierende Wirkung nachgewiesen werden.

Neben sekundären Parametern, wie Konfiguration, Molekulargewicht und Nicht-Zuckeranteile (Sulfat-, Acetatreste) muß daher für eine immunstimulierende Aktivität von Polysacchariden ein spezieller struktureller Aufbau vorausgesetzt werden. Zur Sicherstellung, daß nicht grundsätzlich jedes Polysaccharid aus Gewebekulturen, das ins Nährmedium sezerniert wird, immunstimulierende Aktivität besitzt, wurde in unseren Testsystemen eine 1:1 Polysaccharidfraktion aus Gloriosa-Gewebekulturen * untersucht. Während im Granulozyten-Test noch geringe Phagozytosesteigerungsraten nachweisbar waren (50% der Phagozytoseaktivität von Polysaccharid EN 1), konnte im Carbon-Clearance-Test keine Aktivität festgestellt werden (DSK=0).

* *Gloriosa superba*, Liliaceen

TEIL F ECHINACEA PURPUREA PRESS-SAFT

Extrakte aus Echinacea purpurea sind in einer ganzen Reihe von Präparaten, die bei leichten Infekten und zur Grippeprophylaxe als sogenannte Umstimmungsmittel empfohlen werden, enthalten. Eingesetzt werden dabei sowohl wässrig-alkoholische Auszüge, aber auch reine, hochverdünnte Pflanzenpreßsäfte (Echinacin^R). Nachdem es sowohl WAGNER und Mitarbeitern (128) als auch im Rahmen dieser Arbeit gelungen war, Polysaccharide mit immunstimulierender Wirkung aus Echinacea purpurea zu isolieren, sollte nun der therapeutisch eingesetzte Preßsaft auf enthaltene Polysaccharide untersucht werden. Zusätzlich sollte der Preßsaft auf lipophile Substanzen geprüft werden, die sich für eine eventuelle Standardisierung besser eignen würden.

I.1. Hydrophiler Preßsaftanteil

I.1.1. Isolierung und Charakterisierung eines Polysaccharides aus dem Echinacea Preßsaft *

Echinacea Preßsaft * wurde zur Abtrennung der Polysaccharid=fraktion mit Alkohol im Verhältnis 1:4 bei 4°C ausgefällt, das Fällungsprodukt in demineralisiertem Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Anschließend wurde das im Wasser gelöste Produkt zuerst gegen 1 l demineralisiertes Wasser dialysiert, dann erschöpfend gegen 2 x 20 l Wasser.

Sowohl das Retentat, als auch das Dialysat wurden gefrier=getrocknet und auf ihre immunstimulierende Wirkung im Granulozytentest überprüft (s. pharmakologischer Teil) .

Zur Reinigung des Retentates wurde dieses über DEAE-Sephrose CL 6 B mit H₂O als Eluens chromatographiert. Neutrale Polysaccharid-Fractionen waren nicht nachzuweisen. Durch Elution mit einem NaCl-Gradienten konnte aber bei

* Der Echinacea purpurea Preßsaft wurde uns freundlicherweise von der Fa. Madaus, Köln Merheim zur Verfügung gestellt.

einer NaCl-Konzentration von 0,25-0,45 N eine saure Polysaccharidfraktion mit positiver optischer Drehung erhalten werden.

Eine HP-GPC-Analyse (Abb. 49) über Porasil 60 + Bondagel 125 zeigte, daß diese Polysaccharidfraktion EPS offensichtlich nicht homogen war. Teilweise wurde das Polysaccharid im Ausschlußvolumen (Peak A), teilweise im Fraktionierungsbereich des Säulensystems eluiert (Peak B). Eine erneute Anionenaustauschchromatographie bzw. mehrere Gelpermeationschromatographien über Sephacryl S 400, Ultragel AcA 202 und AcA 44 führten zu keiner Trennung von Peak A und B, so daß die weitere strukturelle Charakterisierung des "Gemisches" durchgeführt wurde. Der Molekulargewichtsbereich kann annähernd mit 10-50000 angegeben werden.

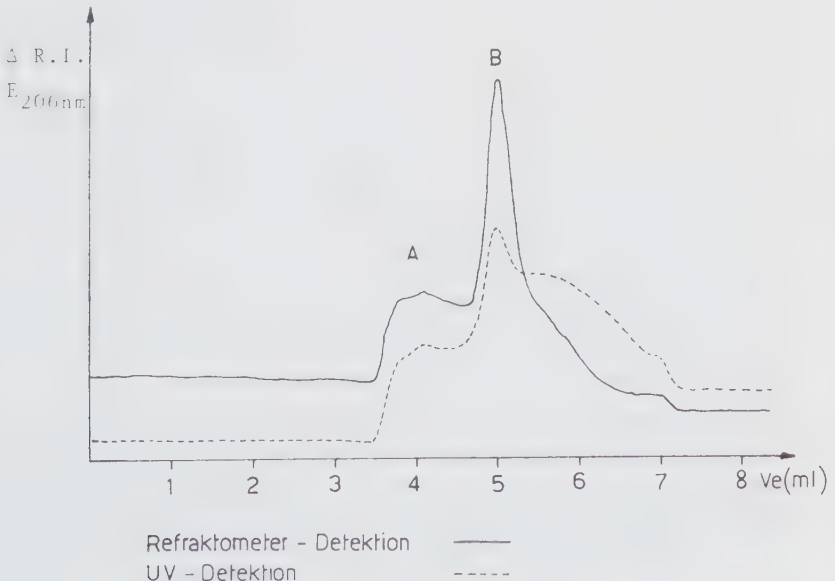


Abb. 49 HP-GPC-Chromatographie der Polysaccharidfraktion EPS aus dem Preßsaft
Säulensystem: μ -Porasil 60 + μ -Bondagel E 125
Eluens: 0,2 M Na-phosphatpuffer pH 6

Zur Prüfung auf Proteinverunreinigungen wurde eine Proteinbestimmung nach LOWRY (78) durchgeführt. Während in der 1:4 Fällung noch über 80% Proteinanteile nachzuweisen waren, waren im Ionenaustausch-gereinigten Produkt EPS nur mehr geringste Proteinmengen vorhanden.

I.1.2. Bestimmung der Zuckerzusammensetzung der Polysaccharidfraction EPS

Tabelle 31: Zuckerzusammensetzung von PS EPS nach Hydrolyse mit 2 N Trifluoressigsäure (1,5 Stunden, 121°C)

Bestimmung über Alditolacetate mittels GC, Säule: SP 2230
T=225°C,
innerer Standard: Inositol

Rhamnose	3,8 %	
Arabinose	3,6 %	
Xylose	3,0 %	
Mannose	1,5 %	
Galaktose	5,9 %	
Glucose	0,8 %	
Neutralzuckergehalt	18,5 %	
Uronsäuregehalt * ca.	51,5 %	* Carbazoltest
Gesamtzuckergehalt	80 %	

Aus Tabelle 31 ist ersichtlich, daß der hydrolisierbare Zuckeranteil nur 18,4 % ausmacht, während im Carbazoltest über 50 % Uronsäuren gefunden wurden.

Zur Identifizierung der Uronsäure wurde das Polysaccharid EPS mit Pektinase bei Raumtemperatur inkubiert. Bereits nach vier Stunden war dünnschichtchromatographisch Galakturonsäure nachzuweisen. Da dieses Enzym spezifisch (1→4) verknüpfte Galakturonsäure aufspaltet, kann man auch hier, wie beim Arabinogalaktan aus der Gewebekultur, α -(1→4) verknüpfte Galakturonsäureketten annehmen, an die einzelne Neutralzuckerketten gebunden sind. Ihr Aufbau wurde nicht untersucht.

I.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Da das vorliegende Polysaccharid möglicherweise ein Gemisch darstellt, kann eine Aussage über die mögliche Struktur nicht gemacht werden. Aufgrund des hohen Gehaltes an (1→4) verknüpfter Galakturonsäure liegt wahrscheinlich ein pektinartiges Polysaccharid vor, das noch neutrale Seitenketten besitzt.

I.2. Lipophiler Preßsaftanteil

I.2.1. Überprüfung des Preßsaftes auf lipophile Inhaltsstoffe

Zur Überprüfung, ob im Echinacin-Preßsaft neben zahlreichen wasserlöslichen Bestandteilen auch lipophile Substanzen enthalten sind, wurde der Preßsaft mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroform-Auszüge wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingengt.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung erfolgte über Kieselgelplatten im Laufmittelsystem Toluol-Ethylacetat (7:3). Nach Detektion mit Vanillin-Schwefelsäure waren im unteren und mittleren R_f-Bereich eine ganze Reihe von verschiedenst gefärbten Zonen sichtbar.

Obwohl eine Zuordnung nicht möglich war, konnte zumindest das Vorhandensein von lipophilen Substanzen im Echinacin-Preßsaft bestätigt werden.

Die von BAUER und WAGNER (129) aus der Droge *Echinacea purpurea* isolierte immunologisch aktive Terpenverbindung konnte im Preßsaft nicht oder nur in Spuren nachgewiesen werden.

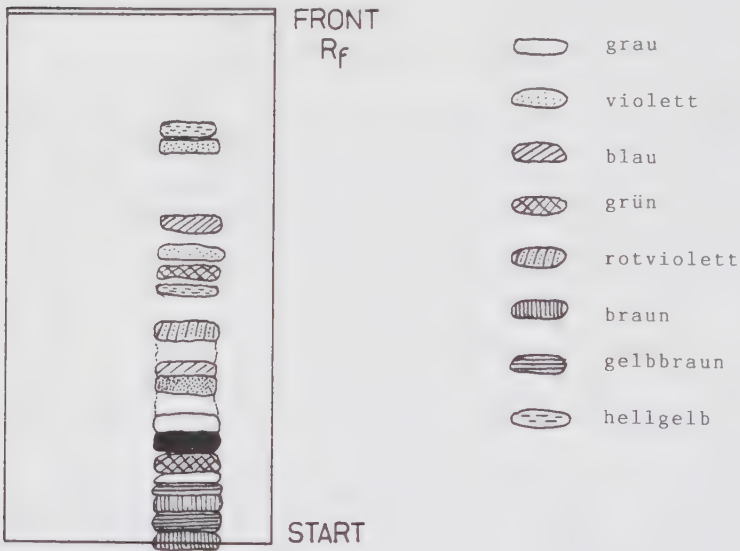


Abb. 50

Dünnschichtchromatogramm des lipophilen Preßsaftanteiles

Laufmittel: Toluol:Etylacetat (7:3)

Detektion : Vanillin/Schwefelsäure 100°C, vis

I.3. Immunologische Untersuchungen des Echinacea- Preßsaftes

Neben zahlreichen Erfahrungsberichten über den therapeutischen Einsatz von Echinacea-Preßsaft sind in der Literatur auch eine ganze Reihe von Publikationen über gezielte immunologische Untersuchungen zu finden. So beobachtete RÖSELER (130) bereits 1950, daß es nach Echinacin^R-Applikation zu starkem Schüttelfrost und Fieberanstieg kam, wobei gleichzeitig jugendliche Leukozyten ausgeschüttet wurden. BITTNER (131) untersuchte Echinacea-Preßsaft im Carbon-Clearance-Test und stellte eine signifikante Steigerung der Phagozytoseaktivität des Retikulo-Endothelialen Systems fest. WACKER (4) wies eine virusprotektive Wirkung des unverdünnten Preßsaftes nach, wenn die Zellkulturen 6 bis 8 Stunden vor der Virus-Applikation mit Echinacea-Extrakt behandelt wurden. Neuere Untersuchungen von TYMPNER (132) und FANSELOW (133) ergaben, daß verdünnter Echinacea-Preßsaft im Granulozytentest nach BRAND eine deutliche Steigerung der Phagozytoserate hervorruft.

Wie aus Tab. 32 ersichtlich, konnten wir die phagozytosesteigernde Wirkung von Echinacea-Preßsaft im Granulozytentest bestätigen. Während bei höheren Konzentrationen immunsuppressive Effekte, teilweise auch Cytotoxizität, nachzuweisen waren, konnte bei Verdünnungen im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-5} mg/ml eine deutliche Steigerung der Phagozytoserate festgestellt werden. Die 1:4 Alkohol-Fällung verhielt sich ähnlich wie der Preßsaft. Auch hier erhielten wir nach anfänglicher Immunsuppression mit zunehmender Verdünnung Steigerungsraten zwischen 15 und 30 %. Ab einer Verdünnung von 10^{-6} konnte keine Wirkung mehr verzeichnet werden.

Die Auftrennung des Preßsaftes in einen nieder- und höhermolekularen Anteil brachte keine Wirkungsverbesserung. Während mit dem Dialysat eine durchschnittliche Phagozytosesteigerung von 25% erzielt werden konnte, war beim Retentat eine Verschiebung des Wirkungsmaximums zu höheren Konzentrationen zu beobachten.

Insgesamt war die Aktivität gegenüber dem reinen Preßsaft

Tabelle 32: Prozentuelle Steigerung der Phagozytose
durch einzelne Echinacea-Preßsaftfraktionen
im Granulozytentest nach BRANDT

Preßsaft= fraktionen	1	Phagozytosewerte in Prozent bei Konz.						mg/ml
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
EP gefrier = getrocknet	-	-78%	-19%	30,5%	25%	12%	-3%	
EP 1:4 Fäl= lung	-	-10%	11%	15 %	24%	29%	-8%	
EP Dialysat	-	22%	25%	39 %	25%	27%	23%	
EP Retentat	-	-32,7%	3,7%	10,8%	10,5%	-	-	
EP Ionen= austausch= fraktion	-11	16 %	9 %	4 %	-	-	-	

- = nicht getestet EP = Echinacea Preßsaft
Prozentangaben bezogen auf die Kontrolle

Tabelle 33: Einfluß von Echinacea-Preßsaftfraktionen auf
die Carbon-Clearance bei Mäusen
Verabreichung von jeweils einmal 10 mg Substanz/kg Maus

Preßsaftfraktionen	$K_{\text{Substanz}} / K_{\text{Kontrolle}}$	DSK-Wert
EP Retentat	1,8	2
EP Dialysat	1,2	1
EP Ionenaustausch= fraktion	1,4	1

herabgesetzt. Das partiell gereinigte Polysaccharid EPS aus dem Retentat des Preßsaftes schließlich zeigte in einer Verdünnung von 10^{-1} mg/ml eine Phagozytoserate von 19%. In konzentrierter Form ließ sich auch hier wieder eine leicht immunsuppressive Aktivität nachweisen. Bei Verdünnungen ab 10^{-3} mg/ml konnte keine Wirkung mehr verzeichnet werden. Mit zunehmender Fraktionierung des Preßsaftes war es also zu keinem Anstieg der Phagozytoseaktivität gekommen, wie dies zu erwarten gewesen wäre, sondern es hatte im Gegenteil eine Abnahme der Wirkung stattgefunden. An der Fähigkeit, in vitro Granulozyten zur Phagozytose zu stimulieren, müssen demnach mehrere Substanzklassen beteiligt sein, die zusammen gegenüber Reinfractionen ein Vielfaches der immunstimulierenden Aktivität besitzen.

Dies konnte auch anhand von Carbon-Clearance-Testungen (Tab.33) nachgewiesen werden. Mit dem Preßsaft-Retentat wurde noch ein DSK-Wert von 2 erreicht, während die Polysaccharidfraktion nur mehr eine schwache Stimulation der Makrophagen bewirkte, und das Dialysat fast überhaupt keine Wirkung hervorrief.

Die beträchtlich höhere Phagozytoserate des Retentates im Vergleich zur Polysaccharidfraktion könnte auf den Proteinanteil, - im Retentat waren aufgrund der Bestimmung nach LOWRY bis zu 80% an Proteinen enthalten -, zurückzuführen sein. Japanische Autoren (134,135) berichten von Aminosäurepeptid-Gemischen mit immunstimulierender Aktivität. Aber auch Ribonukleinsäure und synthetische Peptide wurden als phagozytosestimulierend erkannt (77,135).

TEIL G ZUSAMMENFASSUNG

1) Das Nährmedium von Echinacea purpurea-Gewebe-kulturen enthält Polysaccharide mit immunstimulierender Aktivität. Über fraktionierte Alkohol-Fällungen wurden 1:1 und 1:4 Rohpolysaccharid-Gemische erhalten, die mit Hilfe der Ionenaustausch- und Gelchromatographie in Einzelkomponenten aufgetrennt werden konnten. Insgesamt wurden 3 Polysaccharide rein isoliert.

2) Eines dieser Polysaccharide, das Polysaccharid AG, mit einem mittleren Molekulargewicht von 75000, stellt ein saures Arabinogalaktan dar. Das Grundgerüst baut sich aus (1→3)- β -verknüpften Galaktose-Ketten auf, die über ein Rhamnogalakturonan miteinander verknüpft sind. Jede zweite Galaktose-Einheit der (1→3)- β -Galaktan-Kette ist über das C-6-Atom mit (1→6)- β -Galaktose-Seitenketten verknüpft. Diese wiederum sind zu fast 70% in Position C-3 mit terminaler Arabinose verknüpft. Zusätzlich zu diesen Polysaccharid-Bestandteilen konnten noch längere, stark verzweigte (1→5)- α -Arabinan-Ketten nachgewiesen werden. Ob dieser Arabinanteil am Arabinogalaktanteil oder am Rhamnogalakturonan gebunden ist, konnte nicht geklärt werden. (Strukturvorschlag siehe S. 50)

3) Als Neutralpolysaccharide erhielten wir zwei Polysaccharide, EN 1 und EN 4, mit mittleren Molekulargewichten von ca. 25000 bzw. 10000. HP-GPC-Analysen zeigten, daß diese Polysaccharide gelchromatographisch einheitlich sind.

Beide Polysaccharide stellen Fuco-galacto-xylo-glucane dar, die aus Fucose, Galaktose, Xylose und Glucose im Verhältnis von 0,1:0,3:1:1,5 aufgebaut sind.

Die Hauptketten der Polysaccharide bestehen aus (1→4)- β -verknüpften Glucose-Einheiten, die zu etwa 65% in Position C-6 verzweigt sind.

Die Seitenketten sind zum größten Teil aus terminalen Xylosen-Einheiten aufgebaut. Daneben liegen einzelne Fucose-(1→2)-Galaktose-(1→2)-Xylose- und Galaktose-(1→2)-Xylose-Seitenketten vor.

4) Aus dem Zellmaterial der Gewebekultur (PS EH 1) und aus der Echinacea purpurea-Droge (PS EH 1) konnten durch alkalische Extraktion weitere Xyloglucane isoliert werden. Polysaccharid EZ 1, mittleres Molekulargewicht von ca. 55000, erwies sich in struktureller Hinsicht als nahezu identisch mit den Xyloglucanen aus dem Nährmedium.

Polysaccharid EH 1 ist durch eine noch stärker verzweigte Glucan-Hauptkette ausgezeichnet.

Aufgrund des alkalischen Extraktionsverfahrens waren in beiden Polysacchariden Acetatgruppen nicht mehr nachzuweisen.

5) Zwischen den von PROKSCH (9) aus der Droge isolierten, immunologisch aktiven Polysacchariden und den Polysacchariden, die aus der Gewebekultur dargestellt werden konnten, sind nur geringe strukturelle Gemeinsamkeiten festzustellen. *

Saure Xylane (9) waren erwartungsgemäß in der Gewebekultur nicht zu finden. Aber auch das zweite von PROKSCH isolierte Polysaccharid, ein Arabinorhamnogalaktan, ist ziemlich anders aufgebaut als das von uns isolierte Polysaccharid AG. So wird die Hauptkette des "PROKSCH-Polysaccharides" von Galaktose und Rhamnose im Verhältnis 1:1 gebildet, während der saure Charakter auf Glucuronsäurereste, die in Hauptkette und Seitenketten vorzufinden sind, zurückgeführt wird.

6) Aus dem Echinacea purpurea-Preßsaft gelang es mittels Ionenaustauschchromatographie eine saure Polysaccharidfraktion EPS zu isolieren. Diese Polysaccharidfraktion,

die sich als gelchromatographisch inhomogen herausstellte (Molekulargewichtsbereich: 10000-50000). sollte eine α -(1 $\rightarrow$ 4)-Galakturonsäure-Hauptkette besitzen. Der Aufbau der Seitenketten, die ziemlich heterogen sein dürften, wurde nicht untersucht.

7) In den immunologischen Untersuchungen zeigte das 1:1 Fällungsprodukt aus dem Nährmedium im Granulozyten-Test deutlich höhere Phagozytoseraten, als das 1:4 Fällungsprodukt. Derselbe Aktivitätsunterschied konnte auch bei den aus dem 1:1 bzw. 1:4 Fällungsprodukt isolierten Einzelkomponenten festgestellt werden. Polysaccharide EN 1 aus der 1:1 Fällung zeigte im Gegensatz zu Polysaccharid EN 4 aus der 1:4 Fällung, übereinstimmend im Granulozyten- und Carbon-Clearance-Test, deutlich höhere immunstimulierende Aktivität.

Polysaccharid AG erwies sich, wie andere geprüfte Arabinogalaktane, in unseren Testsystemen als nur mäßig aktiv.

8) Gefriergetrockneter *Echinacea purpurea*-Preßsaft zeigte in verschiedenen Verdünnungsstufen, sowohl im Granulozyten-, als auch im Carbon-Clearance-Test, deutlich phagozytosesteigernde Aktivitäten. In höheren Konzentrationen erwies sich der *Echinacea*-Preßsaft als immunsuppressiv, teilweise auch cytotoxisch. Eine Auftrennung in einen höhermolekulareren und niedermolekulareren Anteil brachte keine Wirkungsverbesserung. Das saure Polysaccharid EPS, das aus dem höhermolekulareren Anteil mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert werden konnte, wies im Gegensatz zum Gesamtpreßsaft nur mehr eine schwache immunstimulierende Wirkung auf.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft der Drogen

I.1. Echinacea purpurea

Das luftgetrocknete, pulverisierte Kraut wurde uns im Jahre 1983 von der Firma Madaus, Köln Merheim, zur Verfügung gestellt.

I.2. Echinacea purpurea Zellkulturen

Die Zell-Suspensionskulturen von Echinacea purpurea wurden von Prof. Zenk (Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München) aus Blatt- und Stengelanteilen von selbstgezüchteten Echinacea purpurea-Beständen angelegt. Nachdem sich Kalli auf verschiedenen festen Nährböden etabliert hatten (LS, DAX, B5CM), wurden sie in ein flüssiges LINSMAIER-Skoog-Nährmedium (24) transferiert. Die Produktion der Suspensionskulturen erfolgte dann in 1 bzw. 1,5 l Erlenmeyer-Kolben mit ca. 250 bzw. 1000 ml Nährmedium im 14-Tagerhythmus bei 26°C.

I.3. Echinacea purpurea Preßsaft

Der Echinacea Preßsaft wurde uns von der Firma Madaus, Köln Merheim zur Verfügung gestellt. (Ernte 82)

II. Allgemeine Arbeitsmethoden

II.1. Physikalisch-chemische Untersuchungen

II.1.1. ¹H-NMR-Spektroskopie

Geräte: Bruker WP-80 bzw. Bruker AM-500

Medium: D₂O

Standard: TSPA d_4 bzw. SR-Spektrometerreferenz bei 6642,72 Hz
Die Verschiebung der Signale wird nach der δ -Skala in ppm angegeben.

II.1.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Gerät: Bruker WP 200 SY (50 MHz)

Medium: D_2O

Standard: SR-Spektrometerreferenz bei 18442,4 Hz bzw.
Dioxan intern

Die Verschiebung der Signale wird nach der δ -Skala in ppm angegeben.

II.1.3. Polarimeter Messungen

Gerät: Perkin-Elmer Polarimeter 241

Küvette: 1 ml; $l=10$ cm

Messung der optischen Drehung bei 365 nm (Hg), wässrige Lösung.

II.1.4. Gaschromatographie

Geräte: a) Perkin-Elmer 900 (für gepackte Säulen)

b) Perkin-Elmer Sigma 1 B (für Kapillarsäulen)

Trärgas: Argon

Detektor : FID

Temperatur: Detektor, Einspritzblock: 250°C

Trennung partiell methylierter Alditolacetate

Säulen: a) OV 225, 25m, 0,23 mm ID, Chrompack 14024-Ka=
pillarsäule, Temperatur: 210°C (isotherm)

b) Glas, 300 cm x 2,0 mm

3% OV 225 auf Chromosorb W-HP, 80/100 mesh

Temperatur: 170°C (isotherm)

Trennung der Alditolacetate (quantitative Neutralzuckerbestimmung)

Säulen: a) Glas, 300 cm x 2,0 mm

3% OV 225 auf Chromosorb W-HP, 80/100 mesh

b) Glas, 6 ft x 2 mm

GP 3 % SP-2330 auf 100/120 Supelcoport

Temperatur: 225°C (isotherm)

II.1.5. Gaschromatographie - Massenspektrometrie (GC-MS-Verfahren)

Gaschromatographie

Gerät A: Carlo Erba (Mailand) Fraktovap 2110

Trärgas: 1,8 ml/min Helium

Säulen: OV 1701 Quarzkapillare 30 m x 0,25 mm ϕ

OV 225 " 25 m

Temperatur: a) Trennung der permethylierten Alditolacetate:

Programm: 100°C bis ca. 260°C mit 3°C/min

b) Trennung der methylierten Disaccharid-Aldi-
tole

Programm: 170°C bis ca. 260°C mit 3°C/min

Gerät B: Carlo Erba (Mailand) Kratos MFC 500

Trärgas: 0,8 ml/min Argon

Säule: OV 225 Kapillarsäule, 0,23 mm ID, Chrompack 14024

Temperatur: Programm 150°C bis 210°C mit 5°C/min

Massenspektrometer

Gerät A: Varian CH 7A gekoppelt mit dem Datensystem

Varian 188-MS

Gerät B: Kratos MS 80 RFA

Energiequelle: in beiden Fällen 70 eV

II.2. Säulenchromatographie

Verwendete Gele

Biogel P 2,100-200 mesh

Fa. Biorad

AcA 202 Ultrogel

Fa. LKB

Sephacryl S 400 superfine	Fa. Pharmacia
DEAE-Sepharose CL-6B	Fa. Pharmacia
DEAE-Trisacryl M	Fa. LKB
Cellulose CC 31	Fa. Whatman

Eluens

H₂O dest.
0,2 N NaCl
0,0-1,0 N NaCl
0,02 N Na-phosphatpuffer pH=7,0
1 N NaOH

Säulen

a) analytisch: ϕ 0,6 mm	h= 120 mm
ϕ 0,6 mm	h= 45 mm
ϕ 16 mm	h= 300 mm
ϕ 16 mm	h= 600 mm
ϕ 16 mm	h= 900 mm
b) präparativ: ϕ 26 mm	h= 300 mm
ϕ 26 mm	h= 600 mm

Auftragmengen

a) analytisch: 5- 50 mg
b) präparativ: 70-400 mg

Pumpe

LKB 2132 Microperpex-Pumpe
kalibriertes Volumen 1 ml
Schlauchdurchmesser 1,3 mm
Förderstrom 1-90 ml/h

Detektor

Differential Refraktometer R 401
Waters Associates Inc.

UV-Detektor LKB 2238 Uvicord S II
UV-Filter 206 nm, 278 nm

II.3 (HP-GPC) HPLC-Gelpermeationschromatographie

Verwendete Säulen

μ-Porasil-GPC-60	(Fa. Waters)
μ-Bondagel E 125	"
μ-Bondagel E 500	"
μ-Bondagel E1000	"
TSK PW 4000	(Fa. LKB)

Zur Chromatographie wurden jeweils zwei Säulen hintereinander geschaltet. Dem jeweiligen Säulensystem wurde eine Vorsäule (l=10 cm Fa. Bischoff), gepackt mit I-125-Proteinmaterial der Fa. Waters, vorgeschaltet.

Pumpe

Lewa, Stuttgart

Fließgeschwindigkeit

16 ml/h

Druck

5-10 bar

Einspritzmenge

5-15 μl einer 1 % Lösung

Detektor

Differential-Refraktometer R 401
UV-Detektor LKB 2158 Uvicord SD, 206 nm

II.4. Zuckeranalysator

Gerät:	Biotronik ZA 5100
Säule:	0,6 cm x 27 cm
	DA-X4-20, Durrum
Säulentemperatur:	58°C
Boratpuffer:	pH 9,1/0,3 M
Farbreagenz:	Orcin/Schwefelsäure
Pufferdurchfluß:	60 ml/h

II.5. Kontinuierliche Membranfiltration (Hollow-Fiber-System) *

Gerät:	Hollow-Fiber Konzentrator CH 4 Fa. Amicon
Patrone:	Hollow-Fiber Patrone H 1 P 10-43

* Das komplette Gerät wurde uns freundlicherweise von Fa. Amicon zur Verfügung gestellt.

II.6. Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC)
10 x 20 cm (Fa. Merck)

Kieselgel 69 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke
0,25 mm (Fa. Merck)

Laufmittelsysteme für Monosaccharide

Chloroform-Methanol-Wasser (64:40:8)

n-Butanol-Aceton:Essigsäure:Wasser (35:35:10:20)

Laufmittelsysteme für Oligosaccharide

n-Butanol-Aceton-Essigsäure-Wasser (35:35:10:20)

n-Butanol-Aceton-Essigsäure-Wasser (35:35:10:40)

Detektion

Anilindiphenylaminophosphorsäure :

2 ml Anilin

2 g Diphenylamin
10 ml Phosphorsäure
ad 100 ml Methanol

Farbreaktion nach 10 min im Trockenschrank bei 100°C

II.7. Dialyse

Dialyseschläuche: Visking-Dialysierschläuche der Fa. Serva
mittlerer Porenradius: 24 Angström

II.8. Uronsäurebestimmung

Nach BITTNER und MUIR (28)
als Standard diente Galakturonsäuremonohydrat (Fa. EGA-
Chemie) das 24 h über P_2O_5 getrocknet worden war.

II.9. Proteinbestimmung

Nach LOWRY (78)

Reagenzien: alkalisches Kupferreagenz

1 ml 2% $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$

1 ml 2% K,Na-tartrat

20 ml 10% Na_2CO_3 in 0,5 N NaOH

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

(Fa. Merck Art.Nr. 9001)

1:10 mit H_2O dest. verdünnt

Standard: Rinderserumalbumin in Konzentration von 10-
150 µg Protein/ml

Proben mit ca. 10-200 µg Protein wurden in 1 ml Wasser
gelöst und 1 ml alkalisches Kupferreagenz zugegeben.

Nach fünf Minuten wurde 3 ml verdünntes Folin-Ciocalteus-
Phenolreagenz zupipettiert und sofort gemischt. Nach 45
Minuten wurde die Extinktion der Lösung gegen einen gleich
behandelten Blindwert gemessen und der Proteingehalt an=
hand der Eichgerade mit Rinderserumalbumin bestimmt.

III. Spezielle Arbeitsmethoden

III.1. Isolierung der Polysaccharide aus dem Zellkultur=medium

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei $T=4^{\circ}\text{C}$ ausgeführt.

III.1.1. Isolierung der Rohpolysaccharide

Die Zellmaterialbestandteile von insgesamt 20 l Zellsuspensionskulturen wurden abfiltriert und der Rückstand mit 5 l destilliertem Wasser nachgewaschen. Die Zellrückstände wurden eingefroren und gefriergetrocknet (270 g gefriergetrocknetes Zellmaterial), während die vereinigten Filtrate (20 l) in Portionen zu je 3 l unter ständigem Rühren mit dem dreifachen Volumen 95% igem Ethanol versetzt wurden. Die sich über Nacht gebildeten Niederschläge wurden zuerst durch vorsichtiges Abdekantieren, anschließend durch Abzentrifugieren von den überstehenden Lösungen abgetrennt (10000 Upm). Die vereinigten Zentrifugate wurden in 4 l dest. Wasser gelöst, unter Eiskühlung langsam mit 15% iger Trichloressigsäure-Lösung versetzt und nach einer Stunde abzentrifugiert. Der gallertige Niederschlag wurde verworfen, der klare Überstand in 4 Portionen zu je 2 l aufgeteilt und mit jeweils 8 l Ethanol ausgefällt. Die sich gebildeten Niederschläge wurden nach 12 Stunden wiederum abzentrifugiert, vereinigt und in 2 l 2% iger Natriumacetatlösung aufgenommen. Die Lösung wurde 8 Stunden am Magnetrührer bei 4°C gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat (1,8 l) wurde nun mit 1,8 l Ethanol versetzt, 12 Stunden stehengelassen, der sich gebildete Niederschlag abzentrifugiert, in 200 ml destilliertem Wasser aufgenommen, 2 Tage gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Der Überstand der 1:1 Fällung wurde mit dem vierfachen Volumen Ethanol versetzt und 48 Stunden stehen gelassen.

Der Niederschlag wurde dann abzentrifugiert, in 50 ml destilliertem Wasser gelöst, 48 Stunden dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1:1 Fällung 2 g ca. 1% bezogen auf gefriergetrocknete Zellbestandteile
1:4 Fällung 1 g ca. 0,5% " "
gefriergetrockneter Zellrückstand: 270 g

III.1.2. Verkürztes Verfahren zur Darstellung der Rohpoly=saccharidfraktionen

Die Zellbestandteile von insgesamt 10 l Zellsuspensionskulturen wurden abfiltriert und der Rückstand mit 2 l dest. Wasser nachgewaschen. Die Zellrückstände wurden gefriergetrocknet (ca. 120 g gefriergetrocknetes Zellmaterial) und die vereinigten Filtrate in Portionen zu je 3 l mit dem dreifachen Volumen 95%igen Ethanol versetzt. Die entstandenen Niederschläge wurden zuerst durch vorsichtiges Abdekantieren, schließlich durch Abzentrifugieren (10000 Upm) von den überstehenden Lösungen abgetrennt. Die vereinigten Zentrifugate wurden in 2 l dest. Wasser gelöst, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (10000 Upm, 30 Minuten) und die überstehende Lösung mit dem gleichen Volumen 95%igen Ethanol versetzt. Die entstandenen Niederschläge wurden nach 12 Stunden abzentrifugiert, anschließend das Zentrifugat in 200 ml dest. Wasser gelöst, die Lösung 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und dann gefriergetrocknet. Der Überstand der 1:1 Fällung (3,6 l) wurde mit 5,2 l Ethanol versetzt, der entstandene Niederschlag nach 48 Stunden abzentrifugiert, dann in 100 ml dest. Wasser gelöst, 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeuten: 1:1 Fällung 1,5 g ca. 1,2% bezogen auf gefrierge-
trocknetes Zellmaterial

1:4 Fällung 0,7 g ca. 0,5% " " "

gefriergetrockneter Zellrückstand: 120 g

III.1.3. Konzentrierung des Nährmediums über kontinuierliche Membranfiltration

4 l abzentrifugiertes Zellsuspensionskultur-Medium (13000 Upm, 30 Minuten) wurde mit Hilfe eines Hollow-Fiber Konzentrators CH 4 (Fa. Amicon), ausgerüstet mit einer Hollow-Fiber-Patrone vom Typ H1 in zwei Stunden auf 400 ml eingengt. Die konzentrierte Lösung wurde nun der unter III.1.1. beschriebenen Fällungsprozedur unterworfen. Auf diese Weise erhielten wir 640 mg eines gefriergetrockneten 1:1 Rohpolysaccharidgemisches, das sich aber wegen fehlender immunstimulierender Aktivität als unbrauchbar erwies.

III.1.4. Isolierung der Einzelkomponenten aus der 1:1 Fällung

A. Anionenaustauschchromatographie:

Die Probenlösungen wurden vor der Aufgabe auf die Säulen zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen abzentrifugiert und anschließend auf die Säulen aufgepumpt. Neutrale Polysaccharidfraktionen wurden mit 1 bis 1,5 Säulenvolumina dest. Wasser eluiert, saure Polysaccharidfraktionen wurden mit einem linearen NaCl-Gradienten abgelöst. Alle Fraktionen wurden dann gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

A.1. Austauschermaterial: DEAE-Sepharose CL 6 B

Säule: $A=0,6 \text{ cm}^2$ $l=12 \text{ cm}$ (analytisch)

Eluens: H_2O dest.

Durchfluß: 10 ml/h

Auftragemenge: 7,0 mg 1:1 Fällung

Gradient: 0 - 1N NaCl (50-50)

Ausbeute:	Fraktion a (0ml - 10 ml)	ca. 29%	*
	Fraktion b (23ml - 34 ml)	ca. 6%	*
	Fraktion c (34ml - 43 ml)	ca. 8%	*
	Fraktion d (43ml - 57 ml)	ca. 23%	*

A.2. Austauschermaterial: DEAE-Sepharose Cl. 6 B

Säule: A=5,3 cm² l=58 cm (präparativ)

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 30 ml/h

Auftragemenge: 300 mg 1:1 Fällung

Gradient: 0 - 1N NaCl (600-600)

Ausbeute:	Fraktion a (0ml - 250ml)	ca. 23%	*
	b (490ml - 634ml)	ca. 5%	*
	c (634ml - 730ml)	ca. 5%	*
	d (730ml - 922ml)	ca. 21%	*

A.3. Austauschermaterial: DEAE-Trisacryl M

Säule: A=5 cm² l=14 cm

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 30 ml/h

Auftragemenge: 70 mg Neutralfraktion a

Gradient: 0 - 1N NaCl (90-90)

Ausbeute: Neutralfraktion a (0 ml - 70 ml) ca. 56% *

B. Gelfiltration

B.1. Gelmaterial: Sephacryl S 400

Säule: A= 2,0 cm² l=60 cm

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 16 ml/h

Auftragmenge: 40 mg Neutralfraktion a

Ausbeute: Polysaccharid EN 1 (50 ml - 110 ml) ca. 50% *
ca. 0,07 % bezogen
auf 100 g Zell=
material

* Die prozentuellen Ausbeuten sind auf die jeweils eingesetzten
Polysaccharidfraktionen bezogen.

III.1.5. Isolierung der Einzelkomponente aus der 1:4
Fällung

C. Anionenaustauschchromatographie

C.1. Austauschermaterial: DEAE-Sephrose CL 6 B

Säule: A = $0,6 \text{ cm}^2$ l = 12 cm (analytisch)

Eluens: H_2O dest.

Durchfluß: 10 ml/h

Auftragmenge: 10 mg 1:4 Fällung

Gradient: 0 - 1N NaCl (85-85)

Ausbeute: Neutralfraktion A (0ml - 11ml) ca. 50% *
saure Fraktion B (22ml - 60ml) ca. 35% *

C.2. Austauschermaterial: DEAE-Sephrose CL 6 B

Säule: A = $5,3 \text{ cm}^2$ l = 47 cm

Eluens: H_2O

Durchfluß: 30 ml/h

Auftragmenge: 250 mg 1:4 Fällung

Gradient: 0 - 1N NaCl (250-250)

Ausbeute: Neutralfraktion A (105ml - 225ml) ca. 48% *
saure Fraktion B (510ml - 615ml) ca. 42% *

C.3. Austauschermaterial: DEAE-Trisacryl M

Säule: A = 5 cm^2 l = 14 cm

Eluens: H_2O dest.

Durchfluß: 37 ml/h

Auftragmenge: 100 mg saure Fraktion B

Gradient: 0 - 1N NaCl (250-250)

Ausbeute: Polysaccharid AG (114ml - 213ml) ca. 82% *
ca. 0,14% bezogen auf
100 g Zellmaterial

D. Gelfiltration

D.1. Gelmaterial: Ultrogel AcA 202

Säule: A= 0,6 cm² l=45 cm

Eluens: 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7/0,15 M NaCl

Durchfluß : 10 ml/h

Auftragmenge: 30 mg Neutralfraktion A

Ausbeute: Polysaccharid EN 4 (10ml - 20ml) ca. 71% *
ca. 0,18% bezogen auf
100 g Zellmaterial

D.2. Gelmaterial: Sephacryl S 400

Säule: A=2,0 cm² l=60 cm

Eluens: 0,2 N NaCl

Durchfluß: 13,7 ml/h

Auftragmenge: 15 mg Neutralfraktion A (=Polysaccharid EN 4)

Ausbeute: PS EN 4 (75ml - 101ml) ca. 90% *

D.3. Chromatographische Bedingungen siehe D.2.

Auftragmenge: 14 mg Polysaccharid AG

Ausbeute: PS AG (57ml - 84ml) ca. 85% *

D.4. Gelmaterial: Biogel P 2

Säule: A=2 cm² l=90 cm / auf 50°C thermostatisiert

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 9 ml/h

Auftragmenge: 70 mg Endoglucanase behandeltes

PS EN 4

Ausbeute: Peak A (50ml - 63ml)	ca. 17%	*
Peak B (64ml - 75ml)	ca. 20%	*
Peak C (76ml - 90ml)	ca. 7%	*
Peak D (91ml - 99ml)	ca. 6%	*

* Die prozentuellen Ausbeuten sind auf die jeweiligen eingesetzten Polysaccharid-Fractionen bezogen.

III.2. Isolierung der Polysaccharide aus dem Zellmaterial der Gewebekultur

III.2.1. Isolierung der Rohpolysaccharide

Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. 100 g gefriergetrocknetes Zellmaterial wurde mit 1,8 l 4 N Natronlauge versetzt und über Nacht am Magnetrührer gerührt. Der Rückstand wurde abfiltriert und mit 1 l 4 N Natronlauge nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden langsam unter Rühren mit dem dreifachen Volumen 95% Ethanol versetzt und der sich über Nacht gebildete Niederschlag von der überstehenden Lösung abzentrifugiert (10000 Upm). Der Niederschlag wurde in 500 ml destilliertem Wasser gelöst, mit Essigsäure ein pH-Wert von 6,8 eingestellt und der Niederschlag, der sich durch das Ansäuern bildete, abzentrifugiert. Die überstehende Lösung (500 ml) wurde mit der gleichen Menge 15% Trichloressigsäure versetzt, 1 Stunde im Eisbad belassen und daraufhin abzentrifugiert. Der gallertige Rückstand wurde verworfen, die klare überstehende Lösung (900 ml) mit 3,6 l 95% Ethanol versetzt, nach 12 Stunden der sich gebildete Niederschlag abzentrifugiert und in 600 ml 2%iger Natriumacetatlösung aufgenommen. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert. Das Filtrat (600 ml) wurde mit der gleichen Menge Ethanol versetzt, der Niederschlag nach 12 Stunden abzentrifugiert und zum Überstand weitere 1800 ml Ethanol zugetropft. Der Niederschlag wurde nach 48 Stunden abzentrifugiert. Beide Fällungen, die 1:1 und 1:4 Fällung, wurden in 200 ml H₂O dest. gelöst, 48 Stunden gegen demineralisiertes Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1:1 Fällung	1,2 g ca. 1,2% *
1:4 Fällung	0,21 g ca. 0,2%

* bezogen auf das gefriergetrocknete Zellmaterial

III.2.2. Isolierung von Einzelkomponenten aus der 1:1 Fällung

E. Ionenaustauschchromatographie

E.1. Austauschermaterial: DEAE Sepharose CL 6 B

Säule: $A=5,3 \text{ cm}^2$ $l=28 \text{ cm}$

Eluens: H_2O dest.

Durchfluß: 30 ml/h

Auftragemenge: 550 mg 1:1 Fällung

Ausbeute: Neutralfraktion EZ (40ml - 110ml) ca. 20% *

F. Adsorptionschromatographie

Das Gelmaterial wurde mit 2 Säulenvolumina 1 N Natronlauge vorgespült, dann mit H_2O dest. equilibriert. Nach der Probenaufgabe wurde ungebundenes Material durch Spülen mit 2 Säulenvolumina Wasser entfernt. Die hängengebliebene Polysaccharidfraktion wurde mit 1 N Natronlauge von der Cellulose CC 31 abgelöst. Die alkalischen Fraktionen wurden mit Essigsäure neutralisiert (pH 5,5), dialysiert und gefriergetrocknet.

F.1. Gelmaterial: Cellulose CC 31

Säule: $A=5,3 \text{ cm}^2$ $l=25 \text{ cm}$

Eluens: H_2O dest./1N NaOH

Durchfluß: 20ml/h

Auftragemenge: 100 mg Neutralfraktion EZ

Ausbeute: ca. 30% adsorbiertes Polysaccharid EZ *

G. Ionenaustauschchromatographie

G.1. Chromatographische Bedingungen siehe E.1

Auftragemenge: 30 mg Polysaccharid EZ

Ausbeute: Neutralfraktion (50ml - 100ml) ca. 50% *

H. Gelfiltration

H.1. Chromatographische Bedingungen siehe D.2.

Auftragemenge: 15 mg Neutralfraktion EZ

Ausbeute: Polysaccharid EZ 1 (59ml - 89ml) ca. 75% *

III.2.3. Isolierung einer Einzelkomponente aus der 1:4 Fällung

I. Ionenaustauschchromatographie

I.1. Chromatographische Bedingungen siehe E.1.

Auftragemenge: 160 mg 1:4 Fällung

Ausbeute: Neutralfraktion (100ml - 150ml) ca. 25%

* Die prozentuellen Ausbeuten sind auf die jeweiligen eingesetzten Polysaccharidfraktionen bezogen.

III.3. Isolierung von Polysacchariden aus Echinacea purpurea-Droge

III.3.1. Isolierung der Rohpolysaccharide

Die Droge wurde einer erschöpfenden Extraktion mit Petrol-
ether, Dichlormethan und Methanol unterzogen und anschlie-
ßend zur weiteren Aufarbeitung an der Luft getrocknet.
500 g der so vorbehandelten Droge wurde nun mit 5 l
0,5 N Natronlauge bei 4°C 12 Stunden extrahiert, der
Extrakt verworfen, und der nicht gelöste Drogenanteil er-
neut mit 5 l 4 N Natronlauge über Nacht mazeriert. Die
unlöslichen Drogenbestandteile wurden am nächsten Tag
abfiltriert und das Filtrat (4l) nach dem Fällungsver-
fahren III.1.1. aufgearbeitet. Durch fraktionierte Ethanol-
fällungen erhielten wir 1:0,5, 1:2 und 1:4 Fällungs-
produkte in folgenden Ausbeuten:

1:0,5 Fällung	4,7 g	ca. 0,9 % *
1:2 "	0,8 g	ca. 0,16 %
1:4 "	0,1 g	ca. 0,02 %

* bezogen auf das eingesetzte Drogenmaterial.

III.3.2. Isolierung von Einzelkomponenten aus der 1:0,5 Fällung

Die Darstellung eines homogenen neutralen Polysaccharides
(EH 1) erfolgte analog der Isolierung des Polysaccharides
EZ 1 aus dem Zellmaterial der Gewebekultur. (vergleiche
III.2.1., III.2.2.)

III.4. Isolierung hydrophiler und lipophiler Substanzen aus dem Echinacea Preßsaft

III.4.1. 1:4 Fällung

500 ml Echinacea purpurea-Preßsaft wurden unter ständigem
Rühren mit 2 l 95% Ethanol versetzt, 3 Tage bei 4°C stehen

gelassen, dann der Niederschlag abzentrifugiert und gefriergetrocknet.

III.4.2. Auftrennung der 1:4 Fällung in einen hochmolekularen und einen niedermolekularen Anteil

1,5 g der 1:4 Fällung wurden in 100 ml H₂O dest. gelöst, unlösliche Bestandteile abzentrifugiert und die überstehende klare Lösung zuerst gegen 1 l H₂O dest., dann gegen 2 x 20 l demineralisiertes Wasser dialysiert. Das Retentat im Dialyseschlauch wurde gefriergetrocknet, das Dialysat (1 l) am Rotavapor bei 30°C auf 100 ml eingengt und ebenfalls gefriergetrocknet.

Ausbeute: Retentat (hochmolekulare Substanzen)	ca. 7,2 %*
Dialysat (niedermolekulare Substanzen)	ca. 53 %

* bezogen auf eingesetzte 1:4 Fällung.

III.4.3. Isolierung eines Polysaccharides aus dem Retentat

J. Ionenaustauschchromatographie

J.1. Austauschmaterial: DEAE-Sepharose CL 6B

Säule: A=5,3 cm² l=28 cm

Eluens: H₂O dest.

Durchfluß: 25 ml/h

Auftragmenge: 119 mg Retentat

Gradient: 0 - 1N NaCl (250-250)

Ausbeute: saure Polysaccharidfraktion EPS (370ml - 568ml)
ca. 12 %

III.4.4. Isolierung lipophiler Inhaltsstoffe aus dem Echinacea Preßsaft

100 ml Preßsaft wurden mit 3 x 100 ml Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Chloroformphasen über Natriumsulfat getrocknet und anschließend am Rotavapor vorsichtig zur Trockene eingengt.

Der Echinacea Preßsaft wurde uns freundlicherweise von der Fa. Madaus zur Verfügung gestellt.

III.5. Auftrennung der Cellulase in einzelne Enzym=
fraktionen

Cellulase: Cellulase ONOZUKA R-10 aus *Trichoderma*
viride der Fa. Sigma (EC 3.2.1.4 Nr.16419)

K. Ionenaustauschchromatographie

K.1. Austauschermaterial: DEAE-Sephrose CL 6 B

Säule: A=2 cm² l=30 cm

Eluens: 20 mM Na-Phosphatpuffer pH 7

Durchfluß: 28 ml/h

Auftragmenge: 200 mg Cellulase ONOZUKA R-10

Gradient: 0 - 0,5 N NaCl (250-250)

Ausbeute: Peak 1 (25ml - 50ml)

Peak 2 (50ml - 100ml)

Peak 3 (220ml- 230ml)

Peak 4 (260ml- 280ml)

Peak 5 (290ml- 320ml)

Peak 6 (380ml- 430ml)

Die erhaltenen Fraktionen (Peak 1-6) wurden gegen 20 mM Phosphatpuffer-Lösung 24 h dialysiert und anschließend eingefroren (-20°C). Zum enzymatischen Abbau der Polysaccharide wurden dann jeweils die vorhandenen Enzym-Lösungen verwendet.

Proteingehalt der Enzymfraktion 6 : 1,75 mg/ml *

* Bestimmung nach LOWRY (78)

III.6. Molekulargewichtsbestimmung

HP-Gelpermeationschromatographie

Säulensystem: μ -Porasil 60 + μ -Bondagel 125
 μ -Bondagel 125 + μ -Bondagel 500

Eluens: 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,0
0,5 M Phosphatpuffer pH 6,0

Durchfluß: 16 ml/h

Eichsubstanzen zur Molekulargewichtsbestimmung:

Glucose

Dextran T 10	Fa. Pharmacia
Dextran T 40	"
Dextran T 70	"
Dextran T 110	"
Dextran T 500	"
Dextran T 2000	"

Einspritzmenge: 15 μ l einer 2% Lösung

Dem jeweiligen Säulensystem wurde eine kurze Vorsäule (10 cm, Fa. Bischoff), gefüllt mit I-125 Proteinmaterial der Fa. Waters, vorgeschaltet.

III.7. Hydrolysebedingungen

III.7.1. 1-2 mg Polysaccharid wurde mit 1-3 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und 2 Stunden am Dampfbad erhitzt. Anschließend wurde die Probe (eventuell Zugabe von Inositol als innerer Standard) unter wiederholter Zugabe von Wasser am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt bis die Lösung neutral reagierte. (44)

III.7.2. 1-2 mg Polysaccharid wurde in 5-20 ml Glasampullen eingewogen und in 1-3 ml 2N TFA gelöst. Nach dem Zerschmelzen der Ampullen wurden diese 1-1,5 h bei $T=121^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank erhitzt. Daraufhin wurde die Reaktionslösung in 25 ml Spitzkolben überführt und nach III.8.1 weiter aufgearbeitet. (19)

III.8. Quantitative Zuckerbestimmung

III.8.1. Darstellung der Alditolacetate

Methode A (46)

Die nach III.7. vorbehandelten Polysaccharide wurden in 5 ml H_2O dest. aufgenommen, mit einer Spatelspitze $NaBH_4$ (alkalische Reaktion) versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde anschließend durch Zugabe von ca. 2 ml Eisessig zerstört und die Lösung im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Zur Entfernung des Borates wurde das Reaktionsgemisch 2 x mit 3 ml MeOH und 2 ml AcOH versetzt und jedes Mal zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wurde nun mit 1 ml einer Mischung aus Essigsäureanhydrid und Pyridin (1:1) versetzt und 1 h am Dampfbad erhitzt. Nach dieser Acetylierung wurde das Gemisch mehrmals mit Toluol zur Trockene eingeeengt, schließlich in 3 ml Dichlormethan aufgenommen und 3 x mit wenig Wasser ausgeschüttelt, und zur Trockene einrotiert. Zur gaschromatographischen Bestimmung wurden die Alditolacetate dann in 20 μ l Dichlormethan gelöst.

Methode B (136)

Die hydrolysierten Polysaccharide wurden in 0,1 ml 1 M Ammoniak gelöst, mit 1 ml $NaBH_4$ -Lösung (2% in DMSO) versetzt und 90 Minuten bei 40°C im Wasserbad reduziert. Überschüssiges $NaBH_4$ wurde mit 0,1 ml Eisessig zerstört. Die Acetylierung des reduzierten Zuckergemisches erfolgte durch Zugabe von 2 ml Essigsäureanhydrid und 0,2 ml 1-Methylimidazol. Nach 15 Minuten wurde überschüssiges Essigsäureanhydrid mit 20 ml eiskaltem Wasser hydrolysiert und die Alditolacetate mit Dichlormethan (ca. 1 ml) ausgeschüttelt. Die Unterphase wurde direkt für die GC-Analyse verwendet.

III.9. Darstellung der methylierten Alditolacetate (49)

2-5 mg Substanz wurden in einem 10-25 ml Injektionsfläschchen in 2-5 ml getrocknetem DMSO (Molekularsieb 4 Å) unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades gelöst, wobei das Fläschchen vor der Versiegelung mit N_2 gesättigt wurde. Daraufhin wurden 1-2 ml Natrium-methylsulfinylmethanid über eine Injektionsnadel zur Lösung zugetropft. Der Ansatz wurde einer dreißigminütigen Ultraschallung ausgesetzt und dann über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Unter Eiskühlung wurden nun tropfenweise 1-2,5 ml Methyljodid zugegeben, wobei eine zweite Injektionsnadel für den notwendigen Druckausgleich sorgte. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin 1 Stunde ultrabeschallt, anschließend in einen Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei 40°C von überschüssigem Methyljodid befreit. Die Lösung wurde nun 12 Stunden gegen 20 l demineralisiertes Wasser dialysiert und dann unter Vakuum zur Trockene eingengt.

Nach der Methylierung von niedermolekularen Substanzen (Oligosaccharide) wurde das Reaktionsgemisch nicht der Dialyse unterworfen, sondern mit 10 ml H_2O dest. versetzt und 4 x mit 6 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten Dichlormethanphasen wurden nun 4 x mit 6 ml H_2O ausgeschüttelt und dann unter Vakuum zur Trockene eingengt.

Zur Darstellung der Alditolacetate wurde der jeweilige Rückstand mit 2-5 ml 90% Ameisensäure aufgenommen und 1 Stunde am Dampfbad erhitzt. Die Ameisensäure wurde danach unter Vakuum abgezogen, der Rückstand in 2 N TFA gelöst und in 5-20 ml Glasampullen überführt. Nach dem Zuschmelzen der Ampulle wurde diese 1 Stunde bei $T=121^\circ C$ im Trockenschrank erhitzt. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurde das Hydrolysegemisch in einen Spitzkolben überführt und die TFA unter Vakuum entfernt. Die weitere

Derivatisierung zu den partiell methylierten Alditolacetaten erfolgte nach Methode A (III.9.1.).

Die methylierten Alditolacetate wurden über GC- sowie über GC/MS-Analyse identifiziert.

III.10. Darstellung der carboxyl-reduzierten methylierten Alditolacetate (65)

5 mg Polysaccharid, das nach III.10. methyliert worden war, wurden nach der Dialyse gefriergetrocknet und anschließend 24 Stunden über P_2O_5 bei $40^{\circ}C$ unter Vakuum getrocknet. Die so getrocknete Substanz wurde in 3 ml Tetrahydrofuran (über Na getrocknet) gelöst, mit 35 mg $LiAlD_4$ versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur am Magnetrührer gerührt. Überschüssiges $LiAlD_4$ wurde anschließend durch Zugabe einiger Tropfen Wasser zerstört. Ungelöste Anteile wurden nun abfiltriert, der Filtrationsrückstand mehrmals mit Chloroform gewaschen und die vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wurde nach III.8.2. hydrolysiert und anschließend zur Darstellung der Alditolacetate nach Vorschrift III.9.1. verfahren.

Die Identifizierung der carboxyl-reduzierten methylierten Alditolacetate erfolgte über eine GC/MS - Analyse.

III.11. Acetylierung von Polysacchariden (48)

1-10 mg Polysaccharid wurde in 0,4 ml Formamid gelöst, mit 0,2 ml Pyridin und 0,15 ml Acetanhydrid versetzt und 3 Stunden am Magnetrührer bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 10 ml eisgekühltes Wasser zugegeben und die ausgefallenen acetylierten Polysaccharide abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2 x mit 1 ml H_2O dest. gewaschen und dann gefriergetrocknet.

III.12. Acetolyse (76)

15 mg Polysaccharid wurden 12 Stunden unter Vakuum über P_2O_5 bei $40^{\circ}C$ getrocknet und anschließend mit Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:1,1 ml) 12 Stunden bei Raumtemperatur, dann 8 Stunden bei $100^{\circ}C$ acetyliert. Das abgekühlte Reaktionsgemisch wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit Essigsäureanhydrid, Eisessig und konz. Schwefelsäure (1:1:0,1 ,1ml) versetzt und 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach diesem Zeitraum wurde das Reaktionsgemisch mit 5 ml Pyridin neutralisiert und unter Vakuum eingeeengt. Der sirupöse Rückstand wurde in 5 ml H_2O dest. suspendiert und daraufhin mit 4 x 5 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol unter Erwärmen auf $50^{\circ}C$ aufgenommen, mit 1 ml 1M ethanolischer Natriumethoxid-Lösung versetzt und 8 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine kleine Kationen-austauschersäule gegeben (Dowex AG 50 W-X8 (H^+)), filtriert und zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 ml H_2O dest. gelöst, unlösliche Anteile abzentrifugiert und die klare überstehende Lösung gefriergetrocknet. Das so hergestellte Oligosaccharidgemisch wurde nun in 5 ml H_2O dest. gelöst und dazu eine Spatelspitze $NaBD_4$ (alkalische Reaktion) gegeben. Nach 2 Stunden wurde überschüssiges $NaBD_4$ mit Eisessig zerstört, die Lösung zur Trockene eingeeengt und das Borat durch zweimalige Destillation mit jeweils 3 ml Methanol und 2 ml Essigsäure entfernt. Die reduzierten Oligosaccharide wurden nun in H_2O dest. gelöst, die Lösung gefriergetrocknet, der Rückstand 12 Stunden über P_2O_5 bei $40^{\circ}C$ unter Vakuum getrocknet und anschließend nach III.10. methyliert. Die methylierten Oligosaccharide wurden über GC/MS-Analysen identifiziert.

III.13. Partialhydrolysen (72) (60)

III.13.1.

90 mg Polysaccharid wurden in 5 ml 0,05 N TFA gelöst und 2 Stunden am Dampfbad erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch unter wiederholter Zugabe von Wasser am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt, bis die Lösung neutral reagierte. Das partiell hydrolysierte Polysaccharid wurde anschließend gefriergetrocknet.

III.13.2.

7 mg Polysaccharid wurden nach III.10. methyliert, die permethylierte Substanz in 5 ml 90%iger Ameisensäure gelöst und 40 Minuten lang auf 70°C erwärmt. Das Hydrolyseprodukt wurde nach Entfernung der Säure gefriergetrocknet und anschließend nach III.9. neuerdings methyliert, allerdings mit CD_3J als Methylierungsmittel, und dann in die permethylierten Alditolacetate überführt.

III.14. Enzymatische Hydrolysen

Verwendete Enzyme:

Cellulase ONOZUKA R-10 aus *Trichoderma viride*

Fa. Serva EC 3.2.1.4. Nr- 16419

β -(1 $\rightarrow$ 4)-Endoglucanase (Enzymfraktion 6, partiell gereinigt aus Cellulase)

Polygalakturonase aus *Apergillus niger*

Fa. Sigma EC 3.2.1.15 Nr P-5146

α -Fucosidase aus Rinder-Nebenhoden

Fa. Sigma EC 3.2.1.51 Nr F 7753

III.14.1. Enzymatische Hydrolyse mit Cellulase (72)

15 mg Polysaccharid wurden in 5 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,7 gelöst und mit 20 mg Cellulase 60 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die höhermolekularen Polysaccharidanteile durch Zugabe von 95% Ethanol (Endkonzentration 80% Ethanol) ausgefällt und

der Niederschlag abzentrifugiert und verworfen. Die überstehende Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand in 2 ml H₂O dest. gelöst und über eine kleine Kationenaustauschersäule (Dowex AG 50 W-X8 (H⁺) ; A=0,12 cm² l=6 cm) gegeben. Das Natrium-Ionen freie Mono- bzw. Oligosaccharidhaltige Eluat wurde gefriergetrocknet, mit NaBD₄ reduziert (III.13.), und anschließend methyliert (III.10.). Die Identifizierung der reduzierten, permethylierten Oligosaccharide erfolgte über GC/MS.

III.14.2. Enzymatische Hydrolyse mit Endo-(1→4)-β-D-Glucanase (15)

70 mg Polysaccharid wurden in 7 ml 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,2 gelöst und mit 3,5 ml Endoglucanaselösung (Enzymfraktion Peak 6, vergleiche III.5.) für 48 Stunden bei 40°C inkubiert. Restliche Enzymaktivität wurde danach durch zehnmütiges Erhitzen am Dampfbad zerstört und das Oligosaccharidgemisch gefriergetrocknet. Die weitere Auftrennung der Oligosaccharide erfolgte über Biogel P 2 (III.1.3. D 4) .

III.14.3. Prüfung auf α-(1→4)-verknüpfte Galakturonsäure (62)

1 mg Polysaccharid wurde in 200 µl H₂O dest. gelöst und mit 5 µl Pektinase 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis freigesetzter Galakturonsäure erfolgt dünn-schichtchromatographisch.

III.14.4. Prüfung auf α-L-Fucose

1 mg Fucose-hältiges Oligosaccharid wurde in 100 µl 0,1 M Natriumacetatpuffer gelöst, mit 100 µl α-L-Fucosidase versetzt und 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Freigesetzte α-Fucose wurde über die Dünnschichtchromatographie nachgewiesen.

III.15. Meßdaten

III.15.1. ^1H -NMR-Spektrometrie

Polysaccharid EN 1 (D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, 500 MHz, interner Standard:
SR-Spektrometerreferenz: 6642,72 Hz)

(ppm) (Int.):

ca. 5,25,4,97(1,5),4,77(18,8),4,75(2,7),4,74(1,5),4,66
(1,5),4,62(1,8),4,59(1,9),4,56(2,4),4,53(1,7),3,99(2,4),
3,95(2,8),3,89(3,4),3,88(3,5),3,85(2,8),3,82(3,7),3,73
(7,4),3,68(4,1),3,65(4,6),3,64(5,5),3,62(5,1),3,56(4,9),
3,54(3,5),2,14(5,4),1,26(1,4)

III.15.2. ^{13}C -NMR Spektrometrie

Polysaccharid EN 4 (D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, 50,3 MHz, interner Standard:
SR-Spektrometerreferenz: 18442,4 Hz)

(ppm) (Int.):

174,22(3,8),103,46(3,9),102,65(10,5),99,63(4,1),99,15
(13,1),80,39(3,9),79,60(5,3),79,41(6,5),79,24(6,3),75,36
(5,6),74,3(14,8),74,04(12,1),73,40(26,0),73,10(15,4),
72,51(5,9),72,29(8,8),71,80(19,0),71,41(4,0),69,76(19,9),
69,18(4,4),68,90(7,3),66,53(5,4),61,87(13,9),61,53(5,2),
61,31(6,2),60,38(4,5),20,67(4,8),17,5

Polysaccharid AG (D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, 50,3 MHz, interner Standard:
SR-Spektrometerreferenz: 18442,4 Hz)

(ppm) (Int.):

109,46(11,4),107,79(3,6),103,71(4,4),103,47(7,6),102,95
(1,4),84,26(13,9),82,64(2,9),82,29(2,2),81,62(13,8),81,20
(2,9),80,39(7,2),76,95(14,3),75,41(3,3),74,02(3,2),73,74
(7,1),73,32(2,4),73,13(2,0),72,97(3,1),71,09(4,7),70,56
(2,0),70,19(10,6),69,60(5,3),69,25(2,5),68,99(6,5),68,76
(9,2),62,89(2,3),61,66(12,9),61,48(2,3),61,34(3,0)

Partiell hydrolyliertes Polysaccharid AGP (D_2O , $T=60^{\circ}C$, 50 MHz,
interner Standard: Dioxan :67,3 ppm)

(ppm):

104,18,104,40,104,54,82,66,82,47,75,88,74,55,73,62,73,48,
71,58,71,08,70,11,69,48,67,80,67,3,67,05,61,78

IV. Spezielle pharmakologische Arbeitsmethoden

IV.1. Granulozytentest (mod. nach BRANDT)

Eine genaue Beschreibung findet man bei WAGNER,H.
(137) und KREUTZKAMP,B. (138).

IV.2. Carbon-Clearance-Test

Eine genaue Beschreibung findet man bei WAGNER,H.
(137) und KREUTZKAMP,B. (138).

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) BÜSING, K.H. und THÜRINGEN, G., Allergie und Asthma 4, 30, (1958)
- 2) CHONÉ, B., Arzneim. Forsch. 11, 611 (1965)
- 3) POHL, P., Med. Klin. 64, 1546 (1969)
- 4) WACKER, A. und HILBIG, W., Planta med. 33, 89 (1978)
- 5) EILMES, H.G., Dissertation, Frankfurt/M., (1976)
- 6) BÜSING, K.H., Arzneim. Forsch. 2, 467 (1952)
- 7) BONADEO, J., BOTAZZI, G. und LAVAZZA, M., Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante off. Aromi, Saponi, Cosmet., Aerosol, 53, 281 (1971)
- 8) WAGNER, H. und PROKSCH, A., Z. Angew. Phytother. 2, 166 (1981)
- 9) PROKSCH, A., Dissertation, München (1982)
- 10) STIMPL, M., PROKSCH, A., WAGNER, H. und LOHMANN-MATTHES, M.L., Infection and Immunity 46, 845 (1984)
- 11) HARNISCHFEGGER, G. und STOLZE, H., notabene medici 10, 484 (1980)
- 12) SIDDIQUI, I.R. und WOOD, P.J., Carbohydr. Res. 54, 231 (1977)
- 13) ZENK, M.H., Pharmazie heute, 3, 131 (1982)
- 14) ZENK, M.H., "Frontiers of Plant Tissue Culture", Ed.: TORPE, T.A., Proceed. of the 4th Intern. Congr. of Plant and Cell Culture, S. 1-13 (1978)
- 15) ZENK, M.H., "The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids", Eds.: Phillipson et al., Verlag Springer, Berlin, Heidelberg (1985)
- 16) MISAWA, M., "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application", Eds.: BARZ, W., REINHARD, E. und ZENK, M.H., S. 17-26, Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1977)
- 17) HAHLBROCK, K. und GRISEBACH, H., Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 105 (1979)
- 18) TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W. und ALBERSHEIM, P., Plant Physiol. 51, 158 (1973)
- 19) BAUER, W., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K. und ALBERSHEIM, P., Plant Physiol. 51, 174 (1973)
- 20) KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.W., BAUER, W. und ALBERSHEIM, P., Plant Physiol. 51, 188 (1973)
- 21) WILDER, B.M. und ALBERSHEIM, Plant Physiol. 51, 889 (1973)

- 22) AKIYAMA, Y. und KATO, K., *Phytochemistry* 21 (8), 2112 (1982)
- 23) AKIYAMA, Y. und KATO, K., *Phytochemistry* 20 (11), 2507 (1981)
- 24) LINSMAIER, E.M. und SKOOG, F., *Physiol. Plant.* 18, 100 (1965)
- 25) CALDES, G., PRESCOTT, B. THOMAS II, C.A. und BAKER, P.J.,
J. Gen. Appl. Microbiol. 27, 157 (1981)
- 26) BOUNDY, J.A., WALL, J.S., TURNER, J.E., WOYCHIK, J.H. und DIMLER,
R.J., *J. Biol. Chem.* 242 (10), 2410 (1967)
- 27) WHISTLER, R.L., SANELLA, J.L., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Eds.: WHISTLER, R.L., BEMLER, J.N., Vol. V, S. 34-36,
Academic Press, New York (1965)
- 28) BITTER, T. und MUIR, H.M., *Anal. Biochem.* 4, 330 (1962)
- 29) BRANDT, L., *Scand. J. Haematol. Suppl.* 2 (1967)
- 30) Firmenschrift der Firma Amicon/Witten, Ultrafiltration, Micro-
filtration
- 31) BLAKE, J.P., MURPHY, P.J. und RICHARDS, G.N., *Carbohydr. Res.*
16, 49 (1971)
- 32) WILKIE, K.C.B. und WOO, S.L., *Carbohydr. Res.* 57, 145 (1977)
- 33) SHIMIZU, K., HASHI, M. und SAKURAI, K., *Carbohydr. Res.* 62, 117
(1978)
- 34) VOLLMAR, A., Dissertation, München (1984)
- 35) THOMODA, M., SHIMIZU, N., SUZUKI, M. und TAKASU, T., *Chem. Pharm.*
Bull. 29 (8), 2277 (1981)
- 36) TOMODA, M. und SATOH, N., *Chem. Pharm. Bull.* 27, (2), 468 (1979)
- 37) ALFREDSON, T.V., WEHR, C.t., TALLMAN, L. und KLINK, F., *J. Liquid*
Chromatogr. 5 (3), 489 (1982)
- 38) KNÖZINGER, E. und RENZ, H., *Chemiker-Zeitung* 98, 194 (1974)
- 39) TOWLE, G.A., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Eds.:
WHISTLER, R.L. und BEMLER, J.N., Vol. VI., S. 510, Academic
Press, New York (1972)
- 40) ABDEL-AKHER, M., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 4970 (1952)
- 41) BARTH, H.G. und REGNIER, F.E., *J. Chromat.* 192, 275 (1980)
- 42) GRANATH, K.A. und KVIST, B.E., *J. Chromat.* 28, 69 (1967)
- 43) SAEMANN, J.F., MOOR, W.E., MITCHEL, R.L. und MILETT, M.A., *Tappi*
37, 226 (1954)
- 44) FENGEL, D. und WEGENER, G., in "Advances in Chemistry Serie"
Nr. 181, S. 145; Eds.: BROWN, R.D., JURAZEK, J.R., *Am. Chem. Soc.*
(1979)

- 45) ADAMS, G.A., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Eds.: WHISTLER, R.L. und BEMILLER, J.N., Vol. V, S.269-276, Academic Press, New York (1965)
- 46) ALBERSHEIM, P., NEVINS, J. ENGLISH, P.D. und KARR, A., Carbohydr. Res. 5, 340 (1967)
- 47) LINDBERG, B., "Methods in Enzymology", Ed.: GINSBURG, Vol. 28, Part. B, Academic Press, New York (1973)
- 48) BJÖRNDAL, H., HELLERQUIST, C.G., LINDBERG, B. und SVENSON, S., Angew. Chem. 82 (16), 643 (1970)
- 49) HAKOMORI, S.I., J. Biochem. (Tokyo) 55 (2), 205 (1964)
- 50) VALENT, S.B., DARVILL, A.G., McNeil, M., ROBERTSEN, B.K. und ALBERSHEIM, P., Carbohydr. Res. 79, 165 (1980)
- 51) HAWORTH, W.N., J. Chem. Soc. (London) 107, 8 (1915)
- 52) PURDIE, T. und IRVINE, J.C., J. Chem. Soc. (London) 83, 1021 (1903)
- 53) ASPINALL, G.O., "The Polysaccharides", Vol 1, Chapt 3, S. 45, Academic Press, New York (1982)
- 54) PREHM, P., Carbohydr. Res. 78, 372 (1980)
- 55) ADAMS, G.A., "Methods in Carbohydrate Chemistry", Eds.: WHISTLER, R.L. und BEMILLER, J.N., Vol. V, S.170 (1965)
- 56) JANSSON, P.E., KENNE, L., LIEDGREN, H., LINDBERG, B. und LÖNNGREN, J., J. Chem. Commun. (Stockholm Univ.) 8 (1976)
- 57) SWEET, D.P., SHAPIRO, R. und ALBERSHEIM, P., Carbohydr. Res. 40, 217 (1975)
- 58) PERLIN, A. und CASU, B., Tetrahedron Lett., 2921 (1969)
- 59) ASPINALL, G.O., "The Polysaccharides", Vol 1, Chapt. 4, S. 135, Academic Press, New York (1982)
- 60) SCHAEFER, J. und STEJSKAL, E.O., Top. Carbon-13-NMR Spectrosc. 3, 283-324 (1979)
- 61) BREITMAIER, E. und BAUER, G., "¹³C-NMR-Spektroskopie", 95 Georg Thieme Verlag Stuttgart (1977)
- 62) COLLINS, G.J. und BRADBURY, H.J., Carbohydr. Res. 93, 136 (1981)
- 63) KOVAK, P., SOKOLOSKI, E.A. und GLAUDEMANN, C.P.J., Carbohydr. Res. 128, 101 (1984)
- 64) VOELTER, W. und BREITMAIER, E., Tetrahedron 29, 3845 (1973)
- 65) SHASKOV, A.S. und CHIZHOV, O.S., Soviet J. of Bioorg. Chem. 2, N.4, 311 (1976)

- 66) CAPEK, P., TOMAN, R., KORDOSOVA, A. und ROSIK, J., Carbohydr. Res. 117, 133 (1983)
- 67) BUCHALA, A. J. und MEIER, H., Carbohydr. Res. 89, 137 (1981)
- 68) KARACSONYI, S., KOVACIK, V., ALFÖLDI, J. und KUBACKOVA, M., Carbohydr. Res. 134, 265 (1984)
- 69) KENNEDY, J. F., Carbohydr. Res. 49, 243 (1976)
- 70) LEHRFELD, J., Analytical Biochemistry 115, 410 (1981)
- 71) REXOVA-BENKOVA, L. und MARKOVIC, O., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 33, 323 (1976)
- 72) UKAI, S. et al., Chem. Pharm. Bull. 25, 338 (1977)
- 73) SOLOV'EVA, T. P., ARSENYUK, L. V. und OVODOV, Y. S., Carbohydr. Res. 10, 13 (1969)
- 74) OVODOV, Y. S., OVODOVA, R. G., SHIBAEVA, V. I. und MIKHEYSKAYA, L. V. Carbohydr. Res. 42, 197 (1975)
- 75) OVODOVA, R. G., VASHOUSKY, V. E. und OVODOV, Y. S., Carbohydr. Res. 6, 328 (1968)
- 76) BAJPAL, K. S. und MUKHERJEE, S., Indian J. Chem. 9, 33 (1971)
- 77) JORDAN, E., Dissertation, München (1985)
- 78) LOWRY, O. H., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 79) STEVENS, B. J. und SELVENDRAN, R. R., Phytochemistry 23 (2), 339 (1984)
- 80) KOCHETKOV, N. K. und CHIZHOV, O. S., Adv. Carbohydr. Chem. 21, 39 (1966)
- 81) KOCHETKOV, N. K. und CHIZHOV, O. S., Tetrahedron 21, 2029 (1965)
- 82) STEPHEN, G. R. und SELVENDRAN, R. R., Phytochemistry 20 (11), 2511 (1981)
- 83) O'NEILL, M. A. und SELVENDRAN, R. R., Carbohydr. Res. 111, 229 (1983)
- 84) LEE, Y. C. und BALLOU, E. E., Biochemistry 4, 287 (1965)
- 85) ASPINALL, G. O. und McKENNA, J. P., Carbohydr. Res. 7, 244 (1968)
- 86) ASPINALL, G. O., RASHBROOK, R. B., und KESSLER, G., J. Chem. Soc. 215 (1958)
- 87) ASPINALL, G. O., McKAY, J. E. und BEGBIE, R., J. Chem. Soc. 214 (1962)
- 88) ASPINALL, G. O. und WHYTE, J. N. C., J. Chem. Soc. 5058 (1964)
- 89) SHOEMAKER, S. P. und BROWN, R. D., Biochim. et Biophys. Acta 523, 147 (1978)

- 90) MANDELS, M. und REESE, E.T., *Develop. Ind. Microbiol.* 5, 5 (1964)
- 91) SELBY, By K., und MAITLAND, C.C., *Biochem. J.* 104, 716 (1967)
- 92) WATANABE, T., TAKAHASHI, K. und MATSUDA, K., *Agric. Biol. Chem.* 44, 791 (1980)
- 93) GAST, J.C., ATALLA, R.H. und McKELVEY, R.D., *Carbohydr. Res.* 84, 137 (1980)
- 94) BRADBURY, J. und JENKINS, G.A., *Carbohydr. Res.* 126, 125 (1984)
- 95) KOVAC, P. und HIRSCH, J., *Carbohydr. Res.* 85, 177 (1980)
- 96) WILKINSON, S.G., *Carbohydr. Res.* 93, 269 (1981)
- 97) DUTTON, G.G. und MERRIFIELD, E.H., *Carbohydr. Res.* 103, 107 (1982)
- 98) MORI, M., EDA, S. und KATO, K., *Carbohydr. Res.* 84, 125 (1980)
- 99) THORPE, R. und OATES, M.D., *Carbohydr. Res.* 60, 407 (1978)
- 100) FROMME, I. und BEILHARZ, H., *Analyt. Biochem.* 84, 347 (1978)
- 101) BELDER, A.N. und NORRMAN, B., *Carbohydr. Res.* 8, 1 (1968)
- 102) BOUVENG, H.O., *Acta Chem. Scan.*, 16, 96 (1961)
- 103) REICHER, F., CORREA, J.B.C. und GORIN, P.A.J., *Carbohydr. Res.* 135, 129 (1984)
- 104) ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., LAU, J., MCNEIL, M., STEVENSON, T. und THOMAS, J., "Abstracts of the XIIth International Carbohydrate Symposium", Eds.: VLIEGENHART, J.F.G., KAMERLING, J.P. und VELDINK, G.A., S. 391, VONK Publishers, Zeist, Niederlande (1984)
- 105) WATANABE, T., SHIDA, M., MURAYAMA, T., FURUYAMA, Y., NAKAJIMA, T., MATSUDA, K. und KAINUMA, K., *Carbohydr. Res.* 129, 229 (1984)
- 106) SRIVASTAVA, H.C. und SINGH, P.P., *Carbohydr. Res.* 4, 326 (1967)
- 107) HSU, D.S. und REEVES, R.E., *Carbohydr. Res.* 5, 202 (1965)
- 108) SIDDIQUI, I.R. und WOOD, P.J., *Carbohydr. Res.* 17, 97 (1971)
- 109) GOULD, S.E.B. und WIGHT, N.J., *Biochem. J.* 124, 47 (1971)
- 110) KATO, Y., ASANO, N. und MATSUDA, K., *Plant Cell Physiol.* 18, 821 (1977)
- 111) KATO, Y. und MATSUDA, K., *Plant Cell Physiol.* 17, 1185 (1976)
- 112) MCNEIL, M., DARVILL, G. und ALBERSHEIM, P., "Fortschritte d. Chem. org. Naturst." 37, 191 (1979)

- 113) MONRO, J.A., PENNY, D. und BAILEY, R.W., *Phytochemistry* 15, 1193 (1976)
- 114) BIOZZI, G., BENACERRAF, B. und HALPERN, B.N., *Br. J. Exp. Pathol.* 34, 441 (1953)
- 115) DREWS, J., *Swiss Pharma* 2, Nr. 9 (1980)
- 116) KABAT, E.A. und BEZER, A.E., *Arch. Biochim. Biophys.* 78, 306 (1958)
- 117) NETA, E., WHANG, H.Y. und MAYER, H., in "Bacterial Lipopolysaccharides" Eds.: KASS, E. und WOLFF, S.M., S. 48-51, Univ. of Chicago Press, Chicago, Illinois (1973)
- 118) RUDBACK, I.A., *J. Immunol.* 106, 993 (1971)
- 119) CHIHARA, G., HAMURO, I., MAEDA, Y.Y., ARAI, Y. und FUKUOKA, F., *Nature* 225, 943 (1970)
- 120) JANN, K. und WESTPHAL, O., in "The Antigens", Eds.: SELA, M., Vol. 3, S. 1-125, Academic Press, New York (1975)
- 121) JENNINGS, H.J., BHATTACHAJEE, A.K., BUNDLE, D.R., KENNY, C.P., ARTIN, A. und SMITH, I.C.P., *J. Inf. Diss.* 136, 578 (1977)
- 122) WHISTLER, R.L., BUSHWAY, A.A. und SINGH, P.P., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 235 (1976)
- 123) SUZUKI, M., CHAKI, F., SUZUKI, S., NISHIKAWA, Y., TAKEDA, T. und TANAKA, M., *Gann* 59, 421 (1968)
- 124) MANKOWSKY, Z.T., DILLER, I.C. und FISHER, M.E., *Cancer Res.* 17, 382 (1957)
- 125) SUZUKI, S., SAITO, T., UCHIYAMA, M. und AKIYA, S., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 16, 2032 (1969)
- 126) NAKAHARA, W., TOKUZEN, R., FUKUOKA, F. und WHISTLER, R.L., *Nature* 216, 374 (1967)
- 127) ODENTHAL, S., *Dissertation, München* (1984)
- 128) WAGNER, H., PROKSCH, A., RIES-MAURER, I., VOLLMAR, A., ODENTHAL, S., STUPPNER, H., JURCIC, K., LE TURDU, M., und HEUR, Y.H., *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 34, 131 (1984)
- 129) BAUER, R. und WAGNER, H., *Publikation in Vorbereitung*
- 130) RÖSELER, W., *Der Krankenhausarzt* 23, 38 (1950)
- 131) BITTNER, E., *Dissertation, Freiburg* (1969)
- 132) THYMPNER, K.D., *Z. Angew. Phytother.* 5 (1981)

- 133) FANSELOW, G., Dissertation, München 1982
- 134) MATSUURA, S., TAKASAKI, H., HIRATANI, H., KOTERA, T, und
FUJIIWARA, S., Jpn, Kokai Tokkyo Koho 75 13, 373, Ref. C. A.
83 114937 (1975)
- 135) NAJJAR, V. A. und NISHIOKA, K., Nature 228, 672 (1979)
- 136) BLAKENEY, A. B., HARRIS, P. J., HENRY, R. J. und STONE, B. A.,
Carbohydr. Res. 113, 291 (1983)
- 137) WAGNER, H., PROKSCH, A., VOLLMAR, A., KREUTZKAMP, B. und
BAUER, J., Planta med. 2, 139 (1985)
- 138) KREUTZKAMP, B. und WAGNER, H., Planta med., in Druck

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Herrn Prof. Dr. H. Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit und deren stets großzügige Förderung.

Herrn Prof. Dr. M. Zenk und seinen Mitarbeitern, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Herstellung der Echinacea-Gewebekulturen.

Herrn Professor Dr. W. Schäfer, MPI, Martinsried für die rasche Durchführung fast aller GC-MS-Analysen.

Herrn Dr. J. Harangi, Institut für Biochemie, Universität Debrecen, für die Aufnahme von 50,3 MHz ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Privat-Dozent Dr. Wrackmeyer und seinen Mitarbeitern, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die Aufnahme von 50,3 MHz ^{13}C -NMR-Spektren.

Herrn Dr. O. Seligmann und Fr. S. Meier, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Aufnahme der 25,15 MHz ^{13}C -NMR-Spektren und die Durchführung einiger GC-MS-Analysen.

Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler, MPI Martinsried, für die Aufnahme eines 500 MHz ^1H -NMR-Spektrums.

Herrn Dr. G. Wegener, Institut für Holzforschung der Universität München, für die Ausführung quantitativer Zuckeranalysen.

Frau Dr. K. Jurcic und Herrn T. Breitsameter, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die freundliche Zusammenarbeit und Durchführung pharmakologischer Teste.

Der Firma Dr. Madaus & Co für die Überlassung von Echinacea-Preßsaft.

Darüberhinaus möchte ich meinen Kollegen, ganz besonders den Polysaccharid-Kollegen, und allen Institutsangehörigen danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

LEBENS LAUF

Hermann Alois S t u p p n e r

geboren am 28.4.1957 in
Deutschnofen (Südtirol/Italien)

seit November 1983 verheiratet
mit Helga Stuppner,
geb. Pantlitschko, Apothekerin

Eltern:

Karl Stuppner, Gastwirt und
Theresia Stuppner, geb. Obkircher

Schulbildung:

1963 - 1968 Volksschule Bozen (I)
1968 - 1976 Franziskaner-Gymnasium
Bozen

Juli 1976 Matura

Studium der Pharmazie:

WS 1976/77 Leopold-Franzens-
bis Universität Innsbruck (A)
WS 1981/82

3.4.1982 Sponsion zum Magister
der Pharmazie

Approbation:

28.4.1983 Università di Padova (I)

Wissenschaftliche

Tätigkeit

Juni 1982 Beginn der vorliegenden
Arbeit unter Leitung von Herrn
Prof. Dr. H. Wagner am Institut
für Pharmazeutische Biologie der
Universität München

